

Programa de Doctorado “Química Ambiental y Fundamental” (RD 1393/2007)
Departamento de Química Analítica. Instituto Universitario de Medio Ambiente
Universidade da Coruña

Estudio de disruptores endocrinos en el medio ambiente

Memoria presentada por

Noelia Salgueiro González

para optar al grado de Doctora por la Universidade da Coruña con
Mención Internacional

Directoras:

Dra. Isabel Turnes Carou

Dra. Soledad Muniategui Lorenzo

Dra. Purificación López Mahía

A Coruña, Julio de 2015



UNIVERSIDADE DA CORUÑA
Departamento de Química Analítica

Estudio de disruptores endocrinos en el medio ambiente

Memoria presentada por

NOELIA SALGUEIRO GONZÁLEZ

Para optar al

GRADO DE DOCTORA

por la Universidade da Coruña

CON MENCIÓN INTERNACIONAL

A Coruña, Julio de 2015



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Departamento de Química Analítica

Dra. D^a. PURIFICACIÓN LÓPEZ MAHÍA, Catedrática y Directora del
Departamento de Química Analítica de la Universidade da Coruña,

AUTORIZA a **D^a. NOELIA SALGUEIRO GONZÁLEZ** a presentar el trabajo
titulado “ESTUDIO DE DISRUPTORES ENDOCRINOS EN EL MEDIO
AMBIENTE” para optar al grado de Doctora por la Universidade da
Coruña con Mención Internacional.

A Coruña, Julio de 2015

Dra. D^a. Purificación López Mahía



UNIVERSIDADE DA CORUÑA
Departamento de Química Analítica

Dra. D^a. ISABEL TURNES CAROU, Profesora Titular, **Dra. D^a. SOLEDAD MUNIATEGUI LORENZO** y **Dra. D^a. PURIFICACIÓN LÓPEZ MAHÍA**
Catedráticas del Departamento de Química Analítica de la Universidade da Coruña,

CERTIFICAN

Que la presente Tesis Doctoral titulada “ESTUDIO DE DISRUPTORES ENDOCRINOS EN EL MEDIO AMBIENTE” se ha realizado bajo su dirección en el Departamento de Química Analítica de la Universidade da Coruña.

Y para que así conste, a los efectos oportunos, firman la presente en A Coruña, a 27 de julio de 2015.

Dra. D^a. Isabel Turnes Carou

Dra. D^a. Soledad Muniategui Lorenzo

Dra. D^a. Purificación López Mahía

*“Motivación no es tener ánimo,
motivación es tener motivos”*

Alfonso Alcántara

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a todas las personas e Instituciones que han colaborado, financiado y apoyado esta Tesis Doctoral, pues sin su ayuda no hubiera sido posible realizarla.

En primer lugar al Departamento de Química Analítica y al Instituto Universitario de Medio Ambiente (IUMA) por haberme dado la oportunidad de realizar esta Tesis y formarme como investigadora, en especial a mis directoras, Dña. Isabel Turnes, Dña. Soledad Muniategui y Dña. Purificación López Mahía, por todo el apoyo y confianza que han depositado en mí.

A la Universidade da Coruña, la Xunta de Galicia, el Campus de Excelencia Internacional Campus do Mar y la RED Regata por la concesión de diferentes contratos y ayudas durante el desarrollo de este trabajo. Me gustaría destacar la ayuda que la Profesora María Teresa Rodríguez Blas, coordinadora del Programa de Doctorado de Química Ambiental y Fundamental, me ha ofrecido en la etapa final de esta Tesis y a Iria Lema, de Biogrup de la Universidade de Santiago de Compostela, por toda su simpatía y disposición.

A los centros de investigación que me han acogido para realizar las estancias, por los conocimientos adquiridos, las experiencias vividas y por permitirme aprender cómo se trabaja en grupos de elevado prestigio nacional e internacional. Al Instituto de Diagnóstico Ambiental y Estudios del Agua del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IDAEA-CSIC), en especial a la Dra. Miren López de Alda y el Dr. Damià Barceló, y al Instituto da Água da Regiao do Norte (IAREN) en especial a la Dra. María Fátima Alpendurada.

Al Instituto Español de Oceanografía de Vigo, en especial a Dña. Victoria Besada y a Dña. Lucía Viñas, por su colaboración en los estudios ambientales realizados y por las muestras proporcionadas. También al Departamento de Ecología y Biología Animal de la Universidade de Vigo, al Dr. Ricardo Beiras, la Dra. Paula Sánchez, Iria, Tania por su disposición a la hora de trabajar en equipo y en especial a la futura Dra. Leti! Porque colaborar contigo ha sido un placer! ☺

*A los Servicios de Apoyo á Investigación (SAI) y a todo el personal que ha estado y está en la unidad de Técnicas cromatográficas. Vero, Cris, Paula y Vane, gracias por toda vuestra ayuda y alegría! En especial a **Gerardo**, porque gracias a tu primer empujón he podido aprender y dominar la técnica de LC-MS!*

*Gracias a **Sol**, por apoyarme y valorarme tanto personal como profesionalmente y sobre todo, por escucharme y entenderme. Gracias también por compartir tu faceta más divertida y tu desparpajo en las distancias cortas! A **Isa**, gracias por escucharme y animarme en los momentos bajos, por transmitirme tu paciencia y tranquilidad, necesaria para este tipo de trabajo. A **Puri**, gracias por ser tan cercana y un ejemplo de mujer todoterreno! Y a **Darío**, gracias por demostrar como con paciencia y buen hacer se puede dirigir un grupo de investigación como el nuestro!*

*A mis queridas compis de despacho **Carmen, Fany, Vero, Gloria y MariPaz!!** Mi más sincero agradecimiento profesional y personal! Gracias por acogerme, ayudarme, aconsejarme, escucharme, abrazarme, cuidarme, acompañarme, valorarme y culturizarme! Gracias por compartir conmigo momentos de pena y llanto y estrés y alegría y euforia! Sois un encanto! ☺ Y a la pequeña **Tanyi**, que en este tiempo ha demostrado que de peque no tiene nada, pues su gran corazón, su gran sonrisa y su alegría hacen que sea muy grande! Vivan las **SuperGirls!** También agradecer a **Flavia** el buen ambiente que ha creado en su estancia, porque te has hecho de querer! Porque espero verte pronto, aunque ahora “eres en Italia” ☺*

*A todos los profesores y tertulian@s del café **Rosa, Maribel, Jorge**, etc. por ese buen ambiente de paz y tranquilidad que reina de 11.30 a 12h! En especial a **Alatzne**, por tener siempre tiempo para mí! A mi querida **Esther**, porque siempre es una alegría verte y aprender*

cosas contigo! A **Elia**, porque este año nos hemos acercado y has sido un gran apoyo para mí ☺ A la gente del IUMA, a María y a Pili, y al resto de personal que forma parte de este grupo de investigación, MariCarmen, Andrade, Elisa, Mariajo, etc. gracias ☺ Y a toda la gente que ha pasado por el depar y ya no está, como Débora, Susana, Rebeca y Gus, por haberme ayudado en la primera etapa de la Tesis.

Y como no, a mis queridos “pringadillos”, también llamados estudiantes de doctorado, para que esta Tesis os de ganas de seguir con vuestro trabajo y terminarlo de manera adecuada! Ya sabéis que tenéis mi apoyo y mis archivos a vuestra disposición ☺ A mi compañera del Portucity **María**, a **Noe**, a **Javi** y a nuestra querida orgánica **Cris**! Un brindis por las conversaciones sobre nuestro futuro, que hacen no perder la ilusión!. Y al resto de estudiantes con los que he coincidido, a los del grado en Química por el buen ambiente en las prácticas, a todos los voluntarios de la SETAC y cómo no, de la BIENAL!

A mis compañeras portuguesas, en especial a **Ana, Vera y Andreia**. Gracias por acogerme, por haber compartido conmigo aspectos de la cultura portuguesa y por las risas en el lab! A la **Profesora Fátima** por recibirme siempre con abrazos y besos!! Y a **Teresa**! Muito obrigada por todo! Por hacerme sentir como en casa y por compartir conmigo tu manera de ver la vida, porque si mucha gente fuese la mitad de positiva que tú, todo sería más fácil. Pronto brindaremos con un vinito de Porto ☺

Y a mis amig@s catalanes! A mi **Paquita**, que se merece todo y las dos sabemos que más pronto que tarde lo vamos a conseguir! A **Quique y Xesca**, mi linda parejita mallorquina a la que adoro! a **Giselle, Vicky, Marcelo, Jaume, Josep, Marta**...gracias por todos esos buenos momentos y por los que estarán por llegar! A mis compis de piso **Esther y María**, que me consta que siguen viviendo con esa energía allá donde están! A **Roser y Dori**, por su ayuda con el LC-MS y por hacerme sentir tan valorada! Y de nuevo gracias a **Miren, Marinella, Sandra, Ethel, Damiá** y resto de personal del IDAEA...esta vez por el gran trato personal ☺ Porque a pesar de haber estado solo 3 meses, he conocido a gente maravillosa, que siempre me recibe con una sonrisa allí donde me ve ☺

Y siiiiiiiiiiiii!!! Gracias a ti **Cayis**!!!!!!!!!!!! (te he dedicado un párrafo, no te quejes!) Por todo...por esos días de 1000 whass (o de mails), por esas canciones mañaneras que hacen mover el cucu, por esos comentarios tranquilizadores sobre mi “hipocondriaquía”, por esas noches locas y esas mañanas de resaca, por esas charlas sobre la lambda-cyhalothrin y compuestos afines y sobre todo...por esas fotos carapán!!!!!!!!!!!! Porque sin ti la vida sería más aburrida! Viva la mare que te parió! (Bueno y Neus y Roc!) ☺

A mis **dos hermanitos Dani y Aleksandra**! Porque lo nuestro es de chiste: van una montenegrina, un catalán y una gallega... ☺ No tengo palabras para describir los buenos momentos que hemos pasado! Porque es ver una de nuestras fotos y sonreír, porque vuestras palabras siempre están llenas de positivismo (bueno Dani, las tuyas sólo a veces), y porque sé que aunque nuestros caminos se hayan separado siempre tendremos tiempo para unirlos de nuevo! I love ü! ☺ Y tb a sus respectivas familias, de las que estoy muy orgullosa! Milun, Vera, Marina, Gio y la peque Yelena...gracias por tratarme como una más y ayudarme y apoyarme siempre en todo ☺

A mi amiga **Patri**, que desde el Instituto sigue a mi lado, en lo bueno y en lo malo...en la salud y en... ☺ a **Nati**, porque eres un símbolo de fuerza y valentía, porque tu sonrisa le alegra el día a cualquiera! A **Antía**, por haberte vuelto a cruzar en mi vida, por aquellas tardes universitarias tiradas en el parque y por las nuevas tardes de quasitreinetañeras ya sentadas en una terraza ☺ que madurez!!! y que caray, porque este año te lo mereces todo!!! I m proud of you! A **Moncho**, porque aunque te vacile y te de caña sabes que te aprecio mucho y que sacas mi instinto maternal, gracias por ser tan bueno conmigo ☺ A **Ana**, porque en poco tiempo me has demostrado lo buena persona que eres, gracias por tus buenos consejos ☺ y como no a **Lore**! Porque tu positivismo y tu locura le quita hierro a todos los problemas!! Porque no hay día que no quedemos que no llegue a casa y piense...”aíss que mujer! Yo con dos años más quiero ser así” ☺

*A la pequeña mini familia de O Temple-San Pedro ☺ A Marta, Lucía y Dolo, por todo su apoyo y ayuda, a pesar de la distancia; a Bea, Santi, Iván y a todos los demás, en especial a **QuiqueQuicolos**! Gracias por las mañanas de ejercicio y las charlas sobre la vida...porque estoy segura de que algún día podremos “emprender” nuestros sueños!*

Y a todos aquellos que en todo este tiempo han gastado un segundo de su tiempo en devolverme la sonrisa, a pesar de los días nublados ☺ Y a todos los amantes de los momentos cerveceros en la terraza de un bar o de los atardeceres en la playa!

*A **MI FAMILIA**, a mis padres, al nené y a mi cuñada por ser el eje central que hace girar mi vida. Por ayudarme siempre e intentar comprenderme, incluso en momentos en los que no sale el sol ☺ También a Rosa y a Mioca, por ser como de la familia y cuidarme ☺ Y como no a **Marilena y a Suso**, por ser tan cercanos desde el primer momento ☺*

*Y finalmente, y destacando que es lo más importante, me gustaría agradecer a **Diego** todo lo que ha hecho por mí en este tiempo, por ser mi amigo, mi amante y compañero, porque contigo la vida es más fácil y sobre todo más feliz! Te quiero, te adoro, eres mi tesoro!*

¡Muchas gracias a todos, porque sois parte de esta Tesis! Ya que no podéis aparecer en el Título de Doctora, al menos haceros este pequeño homenaje ☺

Noe

(6 a.m. de una noche de verano)

AYUDAS Y PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada gracias a la ayuda/financiación otorgada por:

- **Contrato predoctoral** de la Universidade da Coruña, de 02/2010 a 02/2012
- **Ayuda para estancias cortas** en centros de investigación de la Universidade da Coruña en la convocatoria de 2011. Estancia realizada en el Instituto de Diagnóstico Ambiental y Estudios del Agua de del Consejo Superior de Investigaciones científicas (IDAEA-CSIC) en Barcelona, de septiembre a diciembre de 2011.
- **Contrato predoctoral** Xunta de Galicia (Plan I2C) modalidad B en el ámbito del Campus de Excelencia Internacional *Campus do Mar*, de 12/2012 a 12/2015
- **Ayuda** a jóvenes investigadores para la **realización de estancias** de investigación en el **extranjero** de la Rede Galega de Tratamento de Augas (Red REGATA) en la convocatoria de 2015. Estancia internacional llevada a cabo en el Instituto da Água da Região do Norte (IAREN) en Matosinhos, Porto (Portugal) de abril a julio de 2015.

El trabajo desarrollado forma parte de los siguientes proyectos de investigación:

Estudio de la Implementación de la Directiva Marco del Agua al Medio Marino en Galicia (Ref. 09MDS038103PR)

Entidad financiadora: Consellería de Innovación e Industria. Programa de Promoción Xeral de Investigación, Desenvolvemento e Innovación Tecnolóxica (INCITE). Xunta de Galicia

Duración: desde 2009 hasta 2011

Investigador principal: Soledad Muniategui Lorenzo

Entidades participantes: Contaminación Marina (IEO-Centro de Vigo).

Criterios de Calidad Ambiental para Ecosistemas Marinos (Crisismar) (Ref. CTM 2009-10908)

Entidad financiadora: Ministerio de Ciencia e Innovación. Plan Nacional i+D+i (Subprograma MAR)

Duración: desde 2010 hasta 2012

Investigador principal: Ricardo Beiras García-Sabell (ECIMAT-Univ. Vigo)

Entidades participantes: Universidade de Vigo, IEO Centro Vigo y Grupo QANAP.

Programa de consolidación y estructuración de unidades de investigación competitivas (Ref. Expte: 52/2010)

Entidad financiadora: Consellería de Educación e Ordenación Universitaria. Dirección Xeral de Promoción Científica e Tecnolóxica do SUG. Xunta de Galicia

Duración: desde 2010 hasta 2012

Investigador principal: Darío Prada Rodríguez (Coordinador grupo QANAP)

Entidades participantes: Grupo QANAP (UDC/G000343).

Transferencia de herramientas para la Evaluación, Ordenación, Gestión y Educación Ambiental en Estuarios (Ref. 0543-TEAM-MINO-1-E)

Entidad financiadora: Programa de Cooperación Transfronteriza España-Portugal (2007-2013). Cofinanciado por la Unión Europea y Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER)

Duración: desde 2007 hasta 2013

Investigador principal: Ricardo Beiras Garcia-Sabell (ECIMAT-Univ. Vigo)

Grupos participantes: 12 grupos de investigación de España y Portugal, entre los que se encuentra el Grupo QANAP (UDC).

**Programa de Consolidación e estructuración de unidades de investigación competitivas:
Grupos de referencia competitiva (Ref. GRC2013-047)**

Entidad financiadora: Consellería de Educación e Ordenación Universitaria. Cofinanciación Fondo Europeo de Desarrollo (FEDER)

Duración: desde 2013 hasta: 2016

Investigador responsable: Darío Prada Rodríguez (Coordinador Grupo QANAP)

Entidades participantes: Grupo QANAP (UDC/G000343).

Impacto de microplásticos, contaminantes regulados y emergentes en ecosistemas marinos y establecimiento de sus criterios de calidad ambiental (IMPACTA) (Ref. CTM2013-48194-C3-2-R)

Entidad financiadora: Programa Estatal de Investigación, Desarrollo e Innovación orientada a los retos de la sociedad. Convocatoria 2013, Ministerio de Economía y Competitividad.

Financiación FEDER: 50,0%

Duración: desde 01-01-14 hasta 31-12-16

Investigador principal: Soledad Muniategui Lorenzo

Proyecto coordinado: Instituto Español de Oceanografía (IP Coordinador, Víctor Manuel León), Universidade da Coruña (Subproyecto 2) y Universidade de Vigo (IP Ricardo Beiras, Subproyecto 3).

Índice

Acrónimos y abreviaturas	I
Resumen/Resumo/Abstract	VII
Prólogo – ¿Por qué los disruptores endocrinos?	XI
Objetivos y estructura de la Tesis	
Objetivos y estructura de la Tesis	3
Sección I – Introducción	
<i>Resumen Sección I</i>	7
Capítulo I. Disruptores endocrinos bajo estudio	9
1. Disruptores endocrinos	11
1.1. Alquilfenoles	11
1.1.1. Características y propiedades físico-química	12
1.1.2. Toxicología	14
1.1.3. Distribución en el medio ambiente	15
1.2. Bisfenol A	16
1.2.1. Características y propiedades físico-químicas	17
1.2.2. Toxicología	17
1.2.3. Distribución en el medio ambiente	18
2. Legislación	19
2.1. Normativas europeas	19
2.1.1. Ámbito industrial: Fabricación y comercialización	19
2.1.2. Ámbito medioambiental	20
2.1.3. Salud pública	22
2.2. Normativas nacionales	22
<i>Bibliografía</i>	24
Capítulo II. Técnicas analíticas	29
1. Determinación instrumental	31
1.1. Cromatografía de líquidos de alta resolución	33
1.2. Espectrometría de masas: fuente de ionización y analizador de masas	34
1.2.1. Técnicas de ionización	34
1.2.2. Analizadores de masas	37
2. Técnicas de extracción de aguas	40
2.1. <i>Estado del arte</i>	40
2.2. Microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME)	50
2.3. Extracción con disolventes miniaturizada asistida por membranas (MASE)	52
3. Técnicas de extracción de sedimentos	53
3.1. <i>Estado del arte</i>	53
3.2. Extracción selectiva con líquidos a presión (SPLE)	60
3.3. Extracción con agua sobrecalentada (PHWE)	62
4. Técnicas de extracción de biota	63
4.1. <i>Estado del arte</i>	63
4.2. Extracción selectiva con líquidos a presión (SPLE)	70
5. Aseguramiento de la calidad del método analítico	70
5.1. Problemas de contaminación de blancos en el análisis de alquilfenoles y bisfenol A	70

5.2. Estudio de validación: parámetros de calidad analítica	71
5.3. Análisis de muestras	73
5.3.1. Criterio de identificación de analitos en muestras	73
5.3.2. Verificación de la calidad del método analítico	74
<i>Bibliografía</i>	74
Sección II – Metodología analítica	
<i>Resumen Sección II</i>	89
Capítulo III. Análisis de alquilfenoles y bisfenol A en agua	91
1. Reactivos, material e instrumentación	94
2. Desarrollo de un método instrumental de cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tandem (LC-MS/MS)	95
2.1. Optimización de las variables del espectrómetro de masas	95
2.2. Optimización de las variables que afectan a la ionización	97
2.3. Estudio de la separación cromatográfica	99
2.4. Estudio de blancos instrumentales	103
2.5. Estudio de validación del método instrumental	105
3. Aspectos de interés en el pre- y el tratamiento de muestra	106
3.1. Limpieza del material	106
3.2. Almacenamiento de muestra: estudio de estabilidad	107
3.3. Filtración de la muestra acuosa	108
3.4. Filtración del extracto final	110
4. Desarrollo de un método de microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) y determinación por LC-MS/MS para el análisis de APs y BPA en agua	111
4.1. Estudio de las variables de la DLLME	111
4.2. Estudio del efecto matriz	113
4.3. Estudio de validación del método	114
4.4. Aplicación a muestras	116
5. Desarrollo de un método de extracción con disolvente miniaturizada asistida por membranas (MASE) y determinación por LC-MS/MS para el análisis de APs en agua	117
5.1. Acondicionamiento de membranas	117
5.2. Estudio de las variables de MASE para agua de mar	117
5.3. Estudio del efecto matriz	119
5.4. Estudio de validación del método	119
5.5. Aplicación a muestras	121
6. Estudio comparativo de los métodos desarrollados	123
7. Conclusiones	125
<i>Bibliografía</i>	126
Capítulo IV. Análisis de alquilfenoles y bisfenol A en sedimento	129
1. Reactivos, material e instrumentación	130
2. Desarrollo de un método de extracción selectiva con líquidos a presión (SPLE) y determinación por LC-MS/MS para el análisis de APs y BPA en sedimento	132
2.1. Preparación de la muestra	132
2.2. Problemas de contaminación de blancos	133
2.3. Estudio de las variables de la SPLE	133
2.4. Estudio del efecto matriz	136
2.5. Estudio de validación del método	136
2.6. Aplicación a muestras	137

3. Desarrollo de un método de extracción con agua sobrecalentada (PHWE) seguido de una extracción con disolvente asistida por membranas (MASE) y determinación por LC-MS/MS para el análisis de APs en sedimento	139
3.1. Problemas de contaminación de blancos	139
3.2. Estudio de las variables de la PHWE	139
3.3. Estudio del efecto matriz	140
3.4. Estudio de validación del método	140
3.5. “Perfil verde” del método analítico	141
3.6. Aplicación a muestras	144
4. Estudio comparativo de los métodos desarrollados	144
5. Conclusiones	146
<i>Bibliografía</i>	146
Capítulo V. Análisis de alquilfenoles y bisfenol A en biota	149
1. Reactivos, material e instrumentación	151
2. Desarrollo de un método de extracción selectiva con líquidos a presión y determinación por LC-MS/MS para el análisis de APs y BPA en biota	152
2.1. Preparación de la muestra	152
2.2. Estudio de las variables de la SPLE	152
2.3. Problemas de contaminación de blancos	155
2.4. Estudio del efecto matriz	155
2.5. Estudio de validación del método	156
2.6. Aplicación a muestras	157
3. Estudio comparativo de métodos de análisis	159
4. Conclusiones	159
<i>Bibliografía</i>	160
Sección III – Estudios ambientales	
<i>Resumen Sección III</i>	165
Capítulo VI. Estudio de alquilfenoles y bisfenol A en las rías gallegas	167
1. Introducción	169
2. Recogida y análisis de las muestras	173
2.1. Toma de muestra	173
2.2. Análisis de las muestras	174
3. Discusión de resultados	174
3.1. Niveles de APs y BPA en las rías gallegas y el golfo de Vizcaya	175
3.2. Distribución espacial de APs y BPA y posibles fuentes de contaminación	176
3.3. Evaluación del impacto ecológico: cocientes de peligrosidad (<i>risk quotient</i>)	178
3.4. Estimación del nivel de exposición de seres vivos a EDCs en el área bajo estudio	179
3.4.1. Efectos en la fauna acuática	179
3.4.2. Efectos en la salud humana	180
4. Conclusiones	182
<i>Bibliografía</i>	183
Capítulo VII. Impacto de alquilfenoles y bisfenol A en el río Miño	187
1. Introducción	190
2. Recogida y análisis de las muestras	193
2.1. Zona de muestreo y toma de muestra	193
2.2. Análisis de las muestras	195

3. Discusión de resultados	197
3.1. Estudio de APs y BPA en las aguas del río Miño: variación estacional, distribución espacial y fuentes de contaminación	197
3.2. Niveles y distribución espacial de APs y BPA en sedimentos	199
3.3. Concentraciones de APs y BPA en biota: variación estacional y espacial	200
3.4. Partición y bioacumulación de los EDCs bajo estudio en el medio acuático	202
3.5. Impacto de APs y BPA en el medioambiente y la salud humana	203
3.5.1. Evaluación del impacto ecológico: cocientes de peligrosidad (<i>risk quotient</i>)	203
3.5.2. Evaluación del impacto en la salud humana asociada a la ingesta diaria de APs y BPA (<i>daily intake estimations</i>)	205
4. Conclusiones	206
<i>Bibliografía</i>	207
Sección IV. Estancias de investigación	
<i>Resumen Sección IV</i>	215
Capítulo VIII. Análisis de disruptores endocrinos en particulado atmosférico	217
1. Introducción	219
1.1. Compuestos bajo estudio	219
1.1.1. Alquilfenoles y bisfenol A	220
1.1.2. Ftalatos (PE)	220
1.1.3. Hormonas sexuales naturales y sintéticas: estrógenos	221
1.2. Metodologías analíticas utilizadas	222
2. Desarrollo de un método de extracción con líquidos a presión y determinación por LC-MS/MS para el análisis de 13 EDCs en particulado atmosférico	223
2.1. Reactivos, materiales e instrumentación	223
2.2. Desarrollo del método instrumental LC-MS/MS	224
2.3. Estudio parámetros PLE	226
2.3.1. Preparación de la muestra y llenado de la celda de extracción	226
2.3.2. Problemas de contaminación de blancos	226
2.3.3. Estudio del disolvente de extracción y del número de ciclos	226
2.3.4. Cantidad de muestra y etapa de purificación	228
2.4. Estudio del efecto matriz	229
2.5. Estudio de validación del método	230
2.6. Aplicación a muestras	232
3. Estudio comparativo de métodos de análisis	234
4. Conclusiones	235
<i>Bibliografía</i>	235
Chapter IX. Analysis of pesticides in sediment and alga	239
1. Introduction	242
1.1. Target compounds	242
1.2. Previous analytical methodologies for the determination of target pesticides	245
2. Development of two novel, green and automatic analytical methodologies for selected pesticide determination	250
2.1. Chemicals and analytical instrumentation	250
2.2. Ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) methodology	251
2.3. On-line SPE conditions: clean-up step	252
2.4. Extraction of sediment samples	253

2.4.1. Optimization of PLE parameters	253
2.4.2. Matrix effect	256
2.4.3. Validation study	256
2.4.4. Application to sediment samples	258
2.5. Extraction of alga samples	259
2.5.1. Optimization of SPLE parameters	259
2.5.2. Matrix effect	261
2.5.3. Validation study	262
2.5.4. Application to alga samples	264
3. Comparison with previous methodology	265
4. Conclusions	266
<i>Bibliografía</i>	266

Sección V. Conclusiones generales

General conclusions	273
---------------------	-----

Anexos. Publicaciones científicas

Índice anexos	279
<i>Anexo I.</i> Determination of alkylphenols and bisphenol A in seawater samples by dispersive liquid-liquid microextraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry for compliance with environmental quality standards (Directive 2008/105/EC)	281
<i>Anexo II.</i> Blank and sample handling troubleshooting in ultratrace analysis of alkylphenols and bisphenol A by liquid chromatography tandem mass spectrometry	291
<i>Anexo III.</i> Membrane assisted solvent extraction coupled with liquid chromatography tandem mass spectrometry applied to the analysis of alkylphenols in water samples	301
<i>Anexo IV.</i> Analysis of endocrine disruptor compounds in marine sediments by in cell clean up-presurized liquid extraction-liquid chromatography mass spectrometry determination	311
<i>Anexo V.</i> Pressurized hot water extraction followed by miniaturized membrane assisted solvent extraction for the green analysis of alkylphenols in sediments	323
<i>Anexo VI.</i> Fast and selective pressurized liquid extraction with simultaneous in cell clean up for the analysis of alkylphenols and bisphenol A in bivalve molluscs	335
<i>Anexo VII.</i> Occurrence of endocrine disrupting compounds in five estuaries of the northwest coast of Spain: Ecological and human health impact	345
<i>Anexo VIII.</i> Occurrence, distribution and bioaccumulation of endocrine disrupting compounds in water, sediment and biota samples from a European river basin	363
<i>Anexo IX.</i> Determination of 13 estrogenic endocrine disrupting compounds in atmospheric particulate matter by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry	387
<i>Anexo X.</i> Analysis and occurrence of endocrine-disrupting chemicals in airborne particles	401
<i>Anexo XI.</i> Otras publicaciones	411

Acrónimos y abreviaturas

A

AA	Media anual	annual average
ACN	Acetonitrilo	acetonitrile
ADI	Ingesta diaria aceptable	acceptable daily intake
AP	Alquilfenoles	alkylphenols
APE	Alquilfenoles etoxilados	alkylphenol ethoxylates
APEC	Alquilfenoxi carboxilados	alkylphenol carboxylates
APCI	Ionización química a presión atmosférica	atmospheric pressure chemical ionization
API	Ionización a presión atmosférica	atmospheric pressure ionization
APPI	Fotoionización a presión atmosférica	atmospheric pressure photoionization
AR	Recuperación absoluta	absolute recovery
ASE	Extracción acelerada con disolvente	accelerated solvent extraction

B

BAF	Factor de bioacumulación	bioaccumulation factor
BCF	Factor de bioconcentración	bioconcentration factor
BPA	Bisfenol A	bisphenol A
BSTFA	N, O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida	N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide

C

C ₈	Octilsilano	octylsilane
C ₁₈	Octadecilsilano	octadecylsilane
CE	Energía de colisión	collision energy
CID	Disociación inducida por colisión	collision induced dissociation
CPANi	Polianilina	polyaniline
CRM	Material de referencia certificado	certified reference material
CTAB	Bromuro de cetiltrimetilamonio	cetyltrimethyl ammonium bromide
CW/TPR	Carbowax/resina templada	carbowax/templated resin
CXP	Potencial de salida de la celda	cell exit potential

D

DAD	Detector de diodos	Diode array detector
DCM	Diclorometano	dichlorometane
DBP	Dibutilftalato	dibutylphthalate
DEHP	Diethylhexilftalato	diethylhexylphthalate
DES	Dietilestilbestrol	diethylstilbestrol
DEP	Dietilftalato	diethylphthalate
DI	Ingesta diaria	daily intake
DLLME	Microextracción líquido-líquido dispersiva	dispersive liquid-liquid microextraction

DMP	Dimetilftalato	dimethylphthalate
DP	Potencial declustering	declustering potential
dSPE	Extracción en fase sólida dispersiva	dispersive solid phase extraction
dw	Peso seco	dry weight
E		
E1	Estrona	estrone
E2	17-beta-Estradiol	17-beta-estradiol
E3	Estriol	estriol
EC ₅₀	Concentración efectiva	effective concentration
ECD	Detector de captura de electrones	electron capture detector
EDAR	Estación depuradora de aguas residuales -	
EDC	Disruptor endocrino	endocrine disrupting compound
EE2	17-alfa-etinilestradiol	17-alfa-ethynilestradiol
EEF	Factor de equivalencia de estradiol	estradiol equivalency factor
EEQ	Equivalente de estradiol	estradiol equivalent quantity
EFSA	Autoridad Europea de Salud Alimentaria	European Food and Safety Authority
EP	Potencial de entrada	entrance potential
EQS	Normas de Calidad Ambiental	Environmental Quality Standard
ESI	Ionización por electrospray	electrospray ionization
F		
FAB	Bombardeo de átomos a gran velocidad	fast atom bombardment
FAO	Organización para la Alimentación y la Agricultura	Food and Agriculture Organization
FID	Detector de ionización de llama	flame ionization detector
FLD	Detector de fluorescencia	fluorescence detector
FT	Transformada de Fourier	Fourier transform
G		
GAC	Química Analítica Verde	green analytical chemistry
GC	Cromatografía de gases	gas chromatography
GPC	Cromatografía de gel permeación	gel permeation chromatography
H		
HDPE	Polietileno de alta densidad	high density polyethylene
HDPP	Polipropileno de alta densidad	high density polypropylene
HFLLME	Microextracción líquido-líquido en fibra hueca	hollow fiber liquid-liquid microextraction
HPLC	Cromatografía de líquido de alta resolución	high pressure liquid chromatography
ht	Marea alta	high tidal

I

IL	Líquidos iónicos	ionic liquid
IS	Patrón interno	internal standard
IT	Trampa iónica	ion Trap

L

LC	Cromatografía de líquidos	liquid cromatography
LC ₅₀	Concentración letal	lethal concentration
LDPE	Polietileno de baja densidad	low density polyethylene
LIT	Trampa iónica lineal	linear ion trap
LLE	Extracción líquido-líquido	liquid-liquid extraction
LLME	Microextracción líquido-líquido	liquid-liquid microextraction
LPME	Microextracción en fase líquida	liquid phase microextraction
lt	Marea baja	low tidal

M

MAC	Concentración máxima admisible	maximum allowable concentration
MAE	Extracción asistida por energía microondas	microwave assisted extraction
MALDI	Desorción/Ionización de matriz asistida por láser	matrix assisted laser desorption/ionization
MASE	Extracción con disolvente asistida por membranas	membrane assisted solvent extraction
MDL	Límite de detección de método	method detection limit
MEC	Concentración ambiental medida	measured environmental concentration
MeOH	Metanol	methanol
MEPS	Microextracción con adsorbente empaquetado	microextraction by packed sorbents
MMLLE	Extracción líquido-líquido con membrana microporosa	microporous membrane liquid-liquid extraction
MQL	Límite de cuantificación de método	method quatitation limit
MRM	Monitoreo de reacciones múltiples	multiple reaction monitoring
MS	Espectrometría de masas	mass spectrometry
MSFD	Directiva Marco sobre la Estrategia Marina	Marine Strategy Water Framework
MSPE	Extracción en fase sólida magnética	magnetic solid phase extraction
MSPD	Dispersión de matriz en fase sólida	matrix solid phase dispersion
MTSTFA	N-metil-N(trimetilsilil)trifluoroacetamida	N-methylN(trimethylsilyl)trifluoroacetamide
MW	Peso molecular	molecular weight

N

4-NP 4- <i>n</i> -NP	4-nonilfenol (isómero lineal)	4-nonylphenol (linear isomer)
NP	Nonilfenol	nonylphenol

NPE	Nonilfenol etoxilado	nonylphenol ethoxylate
O		
4-OP 4- <i>n</i> -OP	4-octilfenol (isómero lineal)	4-octylphenol (linear isomer)
4-tOP	4-tert-octilfenol	4-tert-octylphenol
OPE	Octilfenol etoxilado	octylphenol ethoxylate
P		
PAH	Hidrocarburo aromático policíclico	polycyclic aromatic hydrocarbon
PC	Policarbonato	polycarbonate
PCB	Policlorobifenilos	polychlorinated biphenyls
PCP	Productos de higiene personal	personal care products
PDBE	Bifenilos polibromados	polybrominated biphenyls
PDMS	Polidimetilsiloxano	polydimethylsiloxane
PES	Poliestireno	polystyrene
PET	Tereftalato de polietileno	polyethylene terephthalate
PFBBBr	Bromuro de pentafluorobencilo	pentafluorobenzyl bromide
PFBOCl	Cloruro de pentafluorobenzoilo	pentafluorobenzoyl chloride
PFE	Extracción con fluidos presurizados	Pressurized fluid extraction
PHWE	Extracción con agua sobrecalentada	pressurized hot water extraction
PLE	Extracción con líquido a presión	pressurized liquid extraction
PM	Material particulado	Particulate matter
PNEC	Concentración prevista sin efectos	predicted no effect concentration
POCIS	Muestreador pasivo de sustancias polares	polar organic chemical integrative sampler
PP	Polipropileno	polypropylene
PSE	Extracción con disolvente a presión	pressurized solvent extraction
PTFE	Politetrafluoroetileno	polytetrafluoroethylene
PVC	Policloruro de vinilo	polyvinyl chloride
PYR	Piretroide	pyrethroid
Q		
Q	Cuadrapolo	quadrupole
QA/QC	Aseguramiento de la calidad del método analítico	quality assurance/quality control
QqQ	Triple cuadrapolo	triple quadrupole
QuEChERS	-	Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe
R		
RD	Real Decreto	-
RDSE	Extracción con disco agitador	rotating-disk sorptive extraction
RR	Recuperación relativa	relative recovery
RRF	Factor de respuesta relativo	relative response factor
RQ	Cociente de peligrosidad	risk quotient

S

SBSE	Extracción con barras agitadoras	stir bar sorptive extraction
SDME	Microextracción con gota de disolvente	single drop microextraction
SDS	Dodecil sulfato de sodio	sodium dodecyl sulfate
SIM	Monitoreo de iones selectivos	selective ion monitoring
SIMS	Espectrometría de masas de iones secundarios	secondary ion mass spectrometry
SIS	Patrón interno subrogado	surrogate internal standard
SPE	Extracción en fase sólida	solid phase extraction
SPLE	Extracción selectiva con líquidos a presión	selective pressurized liquid extraction
SPME	Microextracción en fase sólida	solid phase microextraction
SRM	Monitoreo de reacción selectiva	selected reaction monitoring

T

TD	Desorción térmica	thermal desorption
TDI	Ingesta diaria tolerable	tolerable daily intake
TLFE	Extracción con membrana líquida	thin liquid film extraction
TS	Termonebulización	thermospray
TOF	Tiempo de vuelo	time of flight

U

UV/Vis	Ultravioleta/Visible	ultraviolet/visible
US	Extracción asistida por energía ultrasonidos	ultrasonic assisted solvent extraction

V

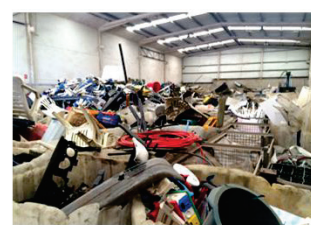
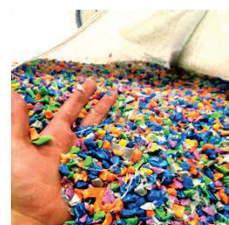
VALLME	Microextracción líquido-líquido asistida por agitación vortex	vortex-assited liquid liquid microextraction
--------	--	--

W

WB	Cuerpo de agua	water body
WFD	Directiva Marco del Agua	Water Framework Directive
ww	Peso húmedo	wet weight

Resumen

En los últimos años los disruptores endocrinos (EDCs) están en el punto de mira de estudios ambientales y ecotoxicológicos. Entre ellos destacan los alquilfenoles y el bisfenol A, tanto por su amplio uso industrial y doméstico como por su elevada actividad estrogénica demostrando efectos adversos a niveles traza. Se descargan a las aguas a través de efluentes industriales y de estaciones depuradoras de aguas residuales afectando principalmente al medio acuático. Por ello se necesitan programas de monitorización ambiental que controlen la presencia de estos contaminantes en el medio ambiente, para garantizar su protección y la de la salud pública. A lo largo de esta memoria se propone metodología analítica que permiten determinar estos compuestos a niveles traza en agua, sedimento y biota. Se trata de métodos novedosos, sensibles, selectivos, que cumplen con los principios de la Química Verde y que mejoran los propuestos previamente en la bibliografía. Aplicando la metodología desarrollada se llevan a cabo los primeros estudios ambientales para evaluar la distribución espacio-temporal de estos contaminantes en Galicia y su comportamiento dentro de un mismo ecosistema (partición agua-sedimento-biota). Además, se realizan dos estancias de investigación en las que se desarrollan métodos para el análisis de otros EDCs y compuestos emergentes en distintas matrices, como particulado atmosférico o alga.



Resumo

Nos últimos anos os disruptores endócrinos (EDCs) atópanse no punto de mira de estudos ambientais e ecotoxicolóxicos. Entre eles destacan os alquifenois e o bisfenol A, ben polo seu amplo uso industrial e doméstico, ben pola súa gran actividade estroxénica, mostrando efectos adversos a niveis traza. Descárganse ás augas por medio de efluentes industriais e de estacións depuradoras de augas residuais afectando principalmente ó medio acuático. Por este motivo, requírense programas de monitorización ambiental que controlen a presenza destes compostos no medio ambiente para garantir a súa protección e a da saúde pública. Ao longo desta memoria desenrólase metodoloxía analítica para determina-los compostos a niveis de traza en auga, sedimento e biota. Trátase de métodos novos, sensibles, selectivos, que cumpren cos principios da Química Verde e melloran as propostas atopadas na bibliografía. Aplicando os métodos expostos, realízanse os primeiros estudos ambientais en Galicia para avalia-la distribución espazo-temporal destes contaminantes e o seu comportamento dentro dun mesmo ecosistema (partición auga-sedimento-biota). Ademais, lévanse a cabo dúas estancias de investigación nas que se propón métodos para a análise doutros EDCs e contaminantes emerxentes en distintas matrices ambientais, como partículas atmosféricas ou algas.



Abstract

Endocrine disrupting compounds (EDCs) have taken part in environmental and ecotoxicological studies in the last years. Alkylphenols and bisphenol A stand out among all of them because of their widely use and their high estrogenic activity (adverse effects at trace levels). These compounds enter into the environment through industrial and wastewater treatment plants effluents affecting the aquatic ecosystem. Consequently, monitoring programs that control the occurrence of these pollutants are needed in order to preserve the aquatic environment and protect human health. This Thesis describes different analytical methodologies to determine alkylphenols and bisphenol A in water, sediment and biota samples at trace levels. Novelty, sensitivity, selectivity and compliance with the Green Chemistry principles are the main advantages of these methods which improve the previous methodologies found in the literature. Primary environmental studies in Galicia are carried out applying the proposed methods, and the spatial-temporal distribution of these compounds and their behaviour into the same ecosystem (water-sediment-biota partition) are also evaluated. Furthermore, two short-stays based on the development of new methodology for the analysis of EDCs and emerging compounds in different matrices such as atmospheric particles or algae were performed.



Prólogo

¿Por qué los disruptores endocrinos?

Los disruptores endocrinos (EDCs), también llamados alteradores endocrinos, son aquellos compuestos naturales y sintéticos capaces de afectar al sistema endocrino de los seres vivos a bajas concentraciones, modificando la actividad hormonal y causando graves daños en los individuos [Olea Serrano *y cols.*, 2001]. Dentro de este grupo de compuestos se engloban un gran número de sustancias (más de 700 actualmente) utilizadas en el ámbito industrial y doméstico como productos de higiene personal, aditivos de plásticos, detergentes, pesticidas, etc.

El interés por los EDCs surgió en la década de los noventa, cuando el número de compuestos conocidos que presentaban estas propiedades y que podían causar daños al medio ambiente y a la salud humana aumentó exponencialmente debido al gran crecimiento de la población y el avance de la sociedad. Es en 1999 cuando la Unión Europea establece la “Estrategia Comunitaria en materia de alteraciones endocrinas” (COM (1999) 706) en la que se define el problema de los disruptores endocrinos y se proponen acciones para abordarlo a corto, medio y largo plazo [European-Commission, 1999]. Dos años después se publica una lista de 553 sustancias químicas y 8 hormonas sospechosas de interferir en el sistema endocrino de humanos y animales (COM(2001)262). Desde entonces, se han publicado diferentes informes que complementan dicha estrategia y que establecen, entre otras consideraciones, recomendaciones a seguir para controlar, evitar o disminuir el uso de estas sustancias tanto en la industria como en la vida diaria, como SEC(2004)137, SEC(2007)1635 y SEC(2011)1001.

Hoy en día se producen miles de toneladas de EDCs al año que se descargan al medio ambiente por emisión directa o a través de los efluentes de las estaciones depuradoras de aguas residuales, donde no se eliminan totalmente. Aunque el agua es el compartimento ambiental más afectado, estos contaminantes pueden adsorberse a sedimentos y bioacumularse en organismos (Figura 1). Las vías de exposición más frecuentes en el caso de los seres humanos son la ingestión, inhalación y/o contacto dérmico.

Paralelamente a los estudios ambientales se desarrollan estudios ecotoxicológicos que permiten conocer los efectos de los EDCs en los organismos y establecer un valor límite a partir del cual se garantice la protección del medio. Entre todos los disruptores endocrinos destacan los estrogénicos, que actúan sobre el sistema reproductor de los individuos. En animales, se ha demostrado que estos compuestos producen descenso de la fertilidad, cambios de sexualidad secundarios o malformaciones en los testículos [Andreu *y cols.*, 2007]. Un claro ejemplo es el caso de la producción de la proteína plasmática *vitellogenin* (común en los peces hembra) en el hígado de los peces macho [Solé *y cols.*, 2002]. Aunque los efectos demostrados en la salud humana no son tan drásticos, destacan la disminución de la producción de

esperma, pubertad temprana y disfunción tiroidea, así como problemas durante el embarazo por la exposición a estos compuestos [Gadzala-Kopciuch y cols., 2008].

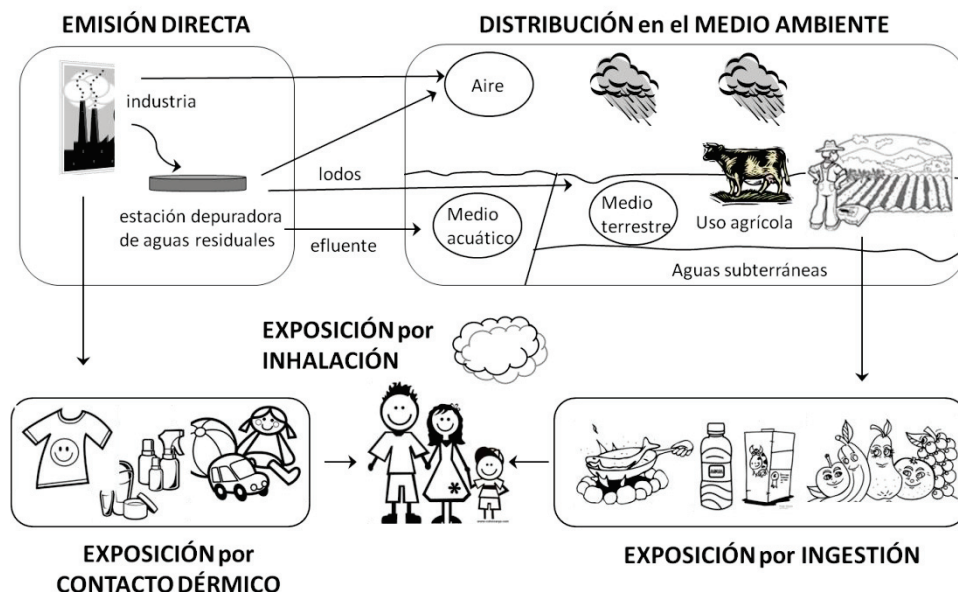


Figura 1. Origen y posible distribución de los disruptores endocrinos en el medio ambiente

Por todo lo anteriormente comentado, la búsqueda de nuevos EDCs y la evaluación de la presencia, distribución en el medio y toxicidad de aquellos ya conocidos son objeto de estudio en numerosas investigaciones actuales, pues se necesitan datos científicos que respondan a cuestiones que están todavía sin resolver. Para contribuir a este fin, en esta Tesis Doctoral se determina la presencia de algunos de los EDCs estrogénicos más importantes en distintas matrices ambientales, haciendo especial hincapié en el medio acuático.

Bibliografía

- Andreu, V., Ferrer, E., Rubio, J.L., Font, G., Picó, Y. *Quantitative determination of octylphenol, nonylphenol, alkylphenol ethoxylates and alcohol ethoxylates by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-mass spectrometry in soils treated with sewage sludges*, Sci Total Environ (2007) 378, 124-129.
- European Commission (1999). http://ec.europa.eu/environment/endocrine/index_en.htm
- Gadzala-Kopciuch, R., Filipiak, A., Buszewski, B. *Isolation, purification and determination of 4-n-nonylphenol and 4-tert-octylphenol in aqueous and biological samples*, Talanta (2008) 74, 655-660.
- Olea Serrano, N., Fernández Cabrera, M.F., Martín Olmgeo, P. *Disruptores endocrinos. El caso particular de los xenobióticos estrogénicos II. Estrogénicos sintéticos*, Salud Ambiental (2001) 1, 64-72.
- Solé, M., Barceló, D., Porte, C. *Seasonal variation of plasmatic and hepatic vitellogenin and EROD activity in carp, Cyprinus carpio, in relation to sewage treatment plants*, Aquat Toxicol (2002) 60, 233-248.

Objetivos y estructura de la Tesis

Esta Tesis Doctoral se engloba en dos de las líneas de investigación del grupo de Química Analítica Aplicada (QANAP) de la Universidade da Coruña, basadas en el desarrollo de metodologías analíticas en los campos ambiental, industrial y agroalimentario, y en la caracterización y monitorización de contaminantes prioritarios en muestras de interés ambiental.

Los disruptores endocrinos (EDCs) son compuestos capaces de alterar el sistema hormonal de los seres vivos a bajas concentraciones y, por ello, son objeto de estudio de numerosas investigaciones actuales. De todos ellos, en esta Tesis Doctoral se consideran los principales EDCs estrogénicos, seleccionados teniendo en cuenta su elevada capacidad para afectar al sistema reproductor de los organismos y su gran uso en aplicaciones industriales y domésticas como aditivos de plásticos, detergentes, pesticidas, etc. Aunque algunos de estos compuestos ya están regulados en diferentes ámbitos, son muchas las incógnitas que aún existen y por tanto, se requieren más estudios que aporten información sobre la presencia, distribución y comportamiento de los EDCs en el medio ambiente.

Por todo lo anteriormente comentado, los objetivos generales de esta Tesis Doctoral son los siguientes:

- a) desarrollar y validar nuevas y eficientes metodologías analíticas para la determinación de alquifenoles y bisfenol A en agua, sedimento y biota
- b) estudiar la presencia de estos compuestos en el medio acuático y proporcionar nuevos datos sobre su distribución y comportamiento en este ecosistema
- c) evaluar el impacto que estos EDCs suponen para el medio ambiente y la salud humana mediante una primera aproximación a la evaluación del riesgo, a fin de garantizar su protección
- d) proponer nuevos métodos de análisis de otros contaminantes, algunos con las mismas propiedades de alteración endocrina, como ftalatos, hormonas sexuales o pesticidas en otras matrices ambientales, como particulado atmosférico o algas

La Tesis se divide en cuatro secciones que incluyen nueve capítulos. En la primera sección, Introducción, se describen los compuestos bajo estudio y se cita la legislación referida al ámbito industrial, medioambiental y de salud pública (Capítulo I); además se presenta una revisión bibliográfica de la metodología analítica para la determinación de alquifenoles y bisfenol A en diferentes matrices ambientales (agua, sedimento y biota), describiendo a continuación el fundamento de las técnicas analíticas utilizadas a lo largo de esta memoria para el mismo fin (Capítulo II).

La segunda sección, Metodología analítica, detalla el desarrollo, validación y aplicación de la metodología analítica propuesta para agua (Capítulo III), sedimento (Capítulo IV) y biota (Capítulo V), mostrando las ventajas y mejoras de éstas con respecto a los métodos previamente publicados como la rapidez, sencillez,

automatización, sensibilidad y el cumplimiento con los principios de la Química Analítica Verde.

En la tercera sección, Estudios ambientales, se recogen dos investigaciones que muestran los primeros datos sobre la presencia de alquifenoles y bisfenol A en el medio acuático de Galicia. La primera se centra en el medio marino, concretamente en las rías gallegas y el golfo de Vizcaya, zonas de gran importancia pesquera, industrial y turística (Capítulo VI); la segunda estudia la distribución de estos contaminantes en el tramo final de la cuenca del río más importante de Galicia, el río Miño (Capítulo VIII).

La cuarta sección, Estancias de Investigación, expone los trabajos realizados en dos estancias llevadas a cabo en centros de gran prestigio internacional en el ámbito de la Química medioambiental, basados en el desarrollo, validación y aplicación de metodología analítica novedosa para la determinación de los compuestos bajo estudio y otros EDCs (ftalatos y hormonas sexuales) en particulado atmosférico (Capítulo VIII) y para el análisis de pesticidas (fungicidas, herbicidas e insecticidas, algunos con propiedades de alteración endocrina) en sedimento y alga (Capítulo IX).

Finalmente se presentan las conclusiones de la Tesis, redactadas en inglés, destacando aquellas aportaciones de mayor importancia e interés. En los Anexos se recopilan los 11 artículos científicos publicados en revistas de alto índice de impacto resultantes de los estudios presentados en esta memoria, con el fin de complementar el contenido de cada Capítulo.

Sección I

Introducción

Resumen: En la sección I Introducción se muestra la importancia del estudio de los alquilfenoles y el bisfenol A, disruptores endocrinos (EDCs) considerados en esta memoria. Estos contaminantes están presentes en el medio ambiente debido a su gran uso industrial y doméstico, especialmente como aditivos de plásticos, y a su eliminación parcial en las estaciones depuradoras de aguas residuales. Debido a su bioacumulación en distintas especies y a su biomagnificación a lo largo de la cadena trófica, estos EDCs han sido regulados a nivel industrial y medioambiental a bajas concentraciones, con el fin de preservar la fauna acuática y proteger la salud pública.

Para controlar y/o monitorizar la presencia de estos contaminantes en el medio se requiere metodología analítica sensible y selectiva que permita alcanzar los bajos niveles establecidos en la legislación. En la última década se han propuesto diferentes métodos para la determinación de estos EDCs en distintas matrices ambientales, caracterizados por ser laboriosos y requerir largos tiempos de extracción, grandes volúmenes de disolventes tóxicos y gran cantidad de muestra. Por ello, cada vez más se recurre a técnicas miniaturizadas y automatizadas que cumplan con los principios de la Química Verde.

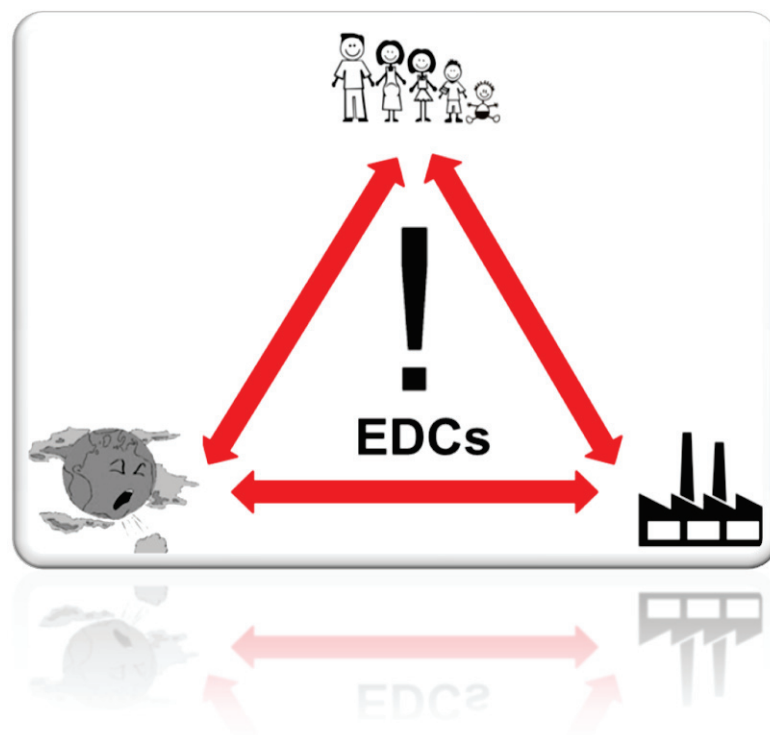
En esta sección se recogen las características de los alquilfenoles y bisfenol A, así como las distintas normativas que los regulan (Capítulo I) Además se describen los métodos encontrados en la bibliografía para el análisis de los EDCs bajo estudio y se detalla el fundamento de las técnicas analíticas desarrolladas a lo largo de esta memoria, tanto de preparación de muestra como de determinación instrumental (Capítulo II).

Summary: Researches about the origin, occurrence, toxicity and behaviour of alkylphenols and bisphenol A (endocrine disrupting compounds considered in this work) are required, as it is shown in the Introductory section. These pollutants are present in the environment because of their widely use in industrial and household applications (especially in plastic manufacture) and their partial elimination in wastewater treatment plants. On the other hand, due to their physical and chemical properties, these EDCs can bio accumulate in organisms, affecting human health. In order to preserve the ecosystem and protect public safety, these compounds have been regulated at low concentrations in industrial applications and in the environment according with different short- and long-term ecotoxicological studies.

Sensitive and selective analytical methodologies are mandatory to achieve low levels established in the legislation. In the last decade, different methods were proposed in the literature for the analysis of these EDCs in water, sediment and biota. Most of them are tedious and requires long extraction times, high volume of toxic solvents and lots of amount of sample. To avoid these procedures, miniaturized and automatic techniques which comply with Green Chemistry principles are in growth nowadays.

Properties, behaviour and distribution of alkylphenols and bisphenol A in the environment as well as legislation are commented in this section (Chapter I). Analytical methods found in the literature for EDCs determination and the theoretical basis of the analytical techniques employed in this work (both instrumental and extraction techniques) are also described (Chapter II).

CAPÍTULO I. Disruptores endocrinos bajo estudio



- *Alquilfenoles y bisfenol A entran en el medio ambiente a través de efluentes de estaciones depuradoras de aguas residuales y descargas industriales*
- *Compuestos con tendencia a adsorberse a sedimentos y bioacumularse en organismos*
- *Valores límite establecidos en distintas normativas para proteger el medio ambiente y/o la salud humana*

Publicaciones científicas

“Ocurrance and behaviour of alkylphenols and bisphenol A in aquatic ecosystems”.

N.Salgueiro-González y cols. *En fase de redacción*

Dentro del grupo de disruptores endocrinos (EDCs) con carácter estrogénico, aquellos que afectan al sistema reproductor de los seres vivos, destacan los alquilfenoles (APs). Debido a su gran uso en aplicaciones industriales y domésticas como surfactantes y aditivos de plástico, a su ubiquidad y a su elevada toxicidad, los APs se consideran contaminantes prioritarios en el medio acuático. Otro EDC estrogénico ampliamente conocido es el bisfenol A (BPA), utilizado en una gran variedad de aplicaciones industriales. Aunque actualmente no está reconocido como contaminante prioritario, su impacto en el medio acuático es todavía un tema de debate.

En este Capítulo se exponen las características físico-químicas de estos EDCs, su toxicología y su distribución en el medio ambiente, poniendo de manifiesto la importancia de su análisis en las distintas matrices ambientales. Además, se recoge la legislación en la que se incluyen estos compuestos, referente a tres ámbitos: industrial, medioambiental y salud pública.

1. DISRUPTORES ENDOCRINOS

1.1. Alquilfenoles

Los alquilfenoles son compuestos químicos sencillos constituidos por un anillo fenólico y una cadena carbonada con n átomos de carbono, en donde n varía entre 1 y 12. Su síntesis se basa en una alquilación de Friedel-Crafts a partir de un fenol, en la que el grupo alquilo de partida depende del alquilfenol que se quiera sintetizar. Un ejemplo es la síntesis del nonilfenol (NP), que utilizan trómeros de propileno (olefinas con nueve carbonos y diferentes grados de ramificación) para la obtención de la mezcla de isómeros que se utiliza industrialmente [Boehme y cols., 2010].

Los APs de mayor interés industrial son los 4-octilfenoles y 4-nonilfenoles, cuya cadena carbonada (de ocho y nueve carbonos respectivamente) se sitúa en posición *para*- con respecto al anillo fenólico. Se emplean como herbicidas, detergentes o como aditivos antioxidantes de polímeros plásticos. De hecho, se añaden al polietileno de alta densidad (HDPE), al tereftalato de polietileno (PET) y al cloruro de vinilo (PVC) para proporcionar estabilidad y disminuir su fragilidad [Loyo-Rosales y cols., 2004].

Otra de sus aplicaciones más destacadas es como reactivo en la síntesis de los alquilfenoles etoxilados (APEs), en la cual reaccionan con óxido de etileno. Algunas aplicaciones de los APEs son la fabricación de pinturas acuosas, productos agrícolas, cosméticos o industria textil. Sin duda, la más importante es como surfactantes no iónicos (componentes de los jabones y detergentes), debido a que los grupos etoxi de su estructura le proporcionan una elevada solubilidad en agua, lo que permite dispersar suciedad y grasa de la superficie de la misma [Ying y cols., 2002]. Existe un gran número de APEs en el mercado, que se distinguen por el número de grupos etoxi

que presentan, que puede variar entre 1 y 50. Sin embargo, el nonilfenol etoxilado (NPE) y el octilfenol etoxilado (OPE) suponen un 80% del uso de todos ellos [Warhust, 1995].

El empleo de los APEs como surfactantes alcanzó su máximo auge a mediados de la época de los 70. Sin embargo, ya en la década de los 80, su uso se restringió en algunos países europeos al determinarse la presencia de APs, considerados tóxicos, entre sus productos de degradación. En los años 90 aumentaron los estudios de toxicidad de APs y se demostró además su actuación como disruptores endocrinos, estableciéndose un control sobre la producción de los correspondientes etoxilados. De hecho, los alcoholes lineales etoxilados son utilizados como compuestos alternativos, aunque no siempre con éxito [Schmitz-Afonso *y cols.*, 2003].

1.1.1. Características y propiedades físico-químicas

Dentro de la familia de los APs, cada compuesto presenta un gran número de isómeros que se diferencian en base a dos criterios: (i) la posición de la cadena carbonada con respecto al anillo fenólico (en cuyo caso hablamos de isómeros *orto*-, *meta*- y *para*-) y (ii) el grado de ramificación de la cadena carbonada (isómeros lineales y ramificados).

Teniendo en cuenta tanto su uso industrial como su toxicidad, en esta memoria se consideran los isómeros ramificados y lineales del 4-octilfenol y del 4-nonilfenol (Figura 2). Estos cuatro APs se describen brevemente a continuación:

- Los isómeros ramificados (*branched isomers*) son el 4-*tert*-octilfenol (4-tOP), también llamado 4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenol, y el nonilfenol (NP), formados por un anillo fenólico y una cadena carbonada ramificada en la posición *para*- al anillo, con ocho y nueve carbonos respectivamente. Dado que son los isómeros que se utilizan industrialmente, su presencia en el medio ambiente es frecuente. A diferencia del 4-tOP que es sólo un isómero, el NP es una mezcla técnica formada por 211 isómeros de difícil diferenciación, lo que complica su estudio [Loos *y cols.*, 2008].
- Los isómeros lineales (*linear isomers*) son el 4-*n*-octilfenol (4-OP ó 4-*n*-OP) y el 4-*n*-nonilfenol (4-NP ó 4-*n*-NP); a diferencia de los anteriores, la cadena alquilada es lineal. Su uso industrial es limitado, por lo que su existencia en el medio es baja en comparación con los isómeros ramificados. Sin embargo, se ha manifestado su presencia en las aguas, debido a la parcial degradación de los APEs en las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR). Por otra parte, diferentes estudios han demostrado su toxicidad y su comportamiento como disruptores endocrinos. Por todos estos motivos, el estudio de los isómeros lineales es también importante.

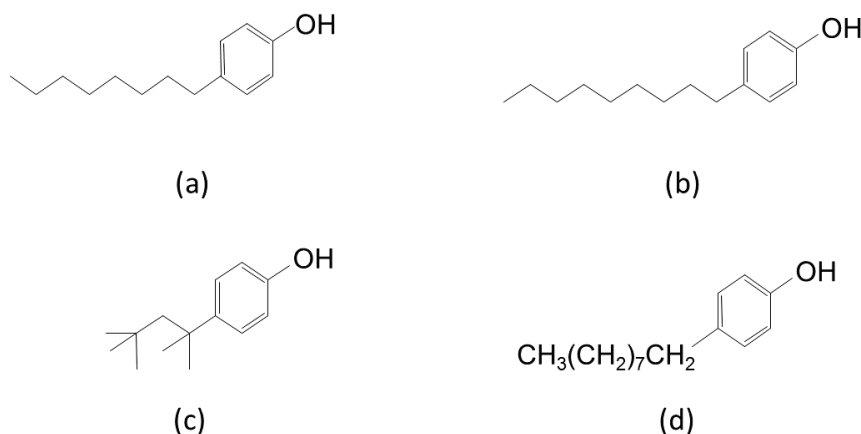


Figura 2. Alquilfenoles considerados en esta memoria: (a) 4-*n*-octilfenol, (b) 4-*n*-nonilfenol, (c) 4-*tert*-octilfenol y (d) nonilfenol

Las propiedades físicas y químicas de los compuestos permiten entender su distribución en el medio ambiente y los posibles efectos que provocan sobre los organismos. De igual manera, estas propiedades han de ser consideradas a la hora de escoger y optimizar el método analítico que se va a utilizar para su determinación. La Tabla 1 recoge las propiedades físico-químicas más relevantes de los APs.

Tabla 1. Propiedades físico-químicas de los alquilfenoles

Compuesto	Nº CAS	MW (g/mol)	Solubilidad a 25°C (mg/L)	log K _{ow}	log K _{oc}	Constante de Henry (atm/M)
4-tOP	140-66-9	206	19,00 ^a	4,28 ^c	4,30 ^a	8,0.10 ⁻⁶ ^e
4-<i>n</i>-OP	1806-26-4	206	12,60 ^d	4,56 ^b	5,18 ^d	6,9.10 ⁻⁵ ^e
NP	25154-52-3	220	5,43 ^d	4,99 ^c	5,39 ^d	3,0.10 ⁻⁵ ^e
4-<i>n</i>-NP	104-40-5	220	4,90 ^d	4,76 ^d	5,57 ^d	1,5.10 ⁻⁵ ^e

^a. [DEFRA, 2008], ^b. [Quintana y cols., 2007], ^c. [Ying y cols., 2002], ^d. [Poerschmann y cols., 2010], ^e. [Dachs y cols., 1999]

Los APs presentan una solubilidad en agua relativamente baja, que disminuye a medida que aumenta el número de átomos de carbono en la cadena alquílica; para el mismo número *n*, los isómeros ramificados son más solubles en agua que sus correspondientes lineales. Son compuestos de carácter lipofílico (log K_{ow}>4) con gran tendencia a acumularse en los tejidos grasos de los organismos, lo que supone un riesgo debido a sus propiedades estrogénicas. Por otra parte, estos contaminantes suelen aparecer asociados a los suelos y sedimentos, disminuyendo la capacidad de adsorción con la polaridad. En cuanto a su volatilidad, los APs son poco volátiles, como demuestran los valores de la constante de Henry (H~10⁻⁵).

1.1.2. Toxicología

Los alquilfenoles son disruptores endocrinos estrogénicos que afectan al sistema reproductor de los seres vivos, actuando sobre las hormonas naturales. En el caso del NP, el mecanismo de actuación se basa en la suplantación de la hormona 17-*beta*-estradiol, uniéndose a los receptores hER α y hER β [Benijts y cols., 2004]. Aunque se supone que el mecanismo de actuación del 4-tOP es similar al del NP, todavía no se ha demostrado experimentalmente.

Los primeros estudios se trasladan a 1936, cuando Dodds y Lawson demostraron el carácter estrogénico de los APs tras realizar diferentes experimentos con ratones, al observar alteraciones en el sistema reproductor de estos animales [Dodds y cols., 1938]. Posteriormente, estas hipótesis fueron confirmadas por multitud de investigadores como Mueller y Kim, que obtuvieron los mismos resultados para otros compuestos de esta familia, como el 4-*tert*-pentilfenol, lo que puso en evidencia que los isómeros *para*- eran los que exhibían estas propiedades [Mueller y cols., 1978].

Los APs se consideran estrogénicos siempre y cuando la cadena alquílica contenga al menos cuatro átomos de carbono en posición *para*- con respecto al grupo hidroxilo, incrementándose la toxicidad a medida que aumenta el número de carbonos [Olea Serrano y cols., 2001]. Por lo tanto, el NP es más tóxico que el 4-tOP, lo que se demuestra con los valores de toxicidad para determinadas especies en agua dulce (mg/L) mostrados en la Tabla 2 [European-Commission, 2005a, b].

Tabla 2. Valores de toxicidad (mg/L) de 4-*tert*-octilfenol y nonilfenol para distintas especies del medio acuático

Especie	Grupo taxonómico	Duración	Índice	Compuesto	Valor (mg/L)
<i>Pimephales promelas</i> (Rafinesque, 1820)	Peces	96 h	LC ₅₀	4-tOP NP	0,250 0,135
<i>Daphnia magna</i> (Straus, 1820)	Crustáceos	48 h	LC ₅₀	4-tOP NP	0,270 0,190
<i>Selenastrum capricornutum</i> (Printz, 1914)	Algas	96 h	EC ₅₀	4-tOP NP	1,90 0,410

LC₅₀ (concentración letal), concentración de contaminante que provoca la muerte al 50% de la población bajo estudio
 EC₅₀ (concentración efectiva), concentración de contaminante que provoca efectos negativos en el 50% de la población bajo estudio

Por otra parte, los valores de toxicidad media de los APes varían entre concentraciones de 0,1 y 20 mg/L dependiendo de la estructura molecular del compuesto. Estos valores son de hasta tres órdenes de magnitud mayores que los de los correspondientes productos de degradación, lo que demuestra su menor toxicidad. Por ejemplo, el NPE presenta un índice LC₅₀ (48 h) de 1,5 mg/L para la pulga de agua *Daphnia magna*, mientras que el del NP es de 0,19 mg/L [Warhust, 1995].

Otro factor a tener en cuenta es la exposición de los seres humanos a los APs, con el fin de evitar o minimizar los riesgos que conllevan. La principal vía de exposición es la ingestión de agua y/o alimentos que contengan estos compuestos, debido principalmente a su migración desde los envases de plástico [Olea Serrano *y cols.*, 2001]. En el caso de personas que trabajan con estas sustancias, la inhalación y la vía dérmica cobran una importancia adicional.

1.1.3. Distribución en el medio ambiente

El origen de los alquilfenoles es antropogénico; es decir, no existen en la naturaleza de manera que cualquier concentración encontrada en el medio ambiente procede de actividades humanas.

Los APs se liberan a las aguas superficiales por medio de dos vías principales: directamente, a través de descargas de aguas residuales industriales y domésticas, o bien a través de los efluentes de las estaciones depuradoras de aguas residuales, en las que surgen como productos de degradación de los APEs, donde no son totalmente eliminados [Schmitz-Afonso *y cols.*, 2003].

En estas estaciones depuradoras, el 80% de los APEs que se eliminan se degradan por la acción microbiana, tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas. Aunque el mecanismo de degradación es complejo, se basa en la pérdida de la cadena polietoxilada, dando lugar a compuestos más persistentes y de mayor toxicidad, como son los alquilfenoles, alquilfenoles etoxilados de cadena corta (monoetoxilados) y alquilfenoxi carboxilados (APECs) [Martínez *y cols.*, 2004]. De 500.000 toneladas de APEs producidas anualmente, se estima que el 60% llega al medio acuático en una de las formas anteriormente comentadas [Ying *y cols.*, 2002].

Desde las aguas superficiales, los APs pueden alcanzar los mares y océanos, o bien degradarse debido a distintas reacciones. En el caso del NP, la fotólisis es el mecanismo más común, mientras que se desconocen los mecanismos de degradación de los octilfenoles. En cuanto a los tiempos de vida media, se establecen valores de 10 a 150 días para el NP y de 35 días para el 4-tOP [European-Commission, 2005a, b], si bien son necesarios más estudios que permitan conocer el mecanismo de degradación, el tiempo necesario para su eliminación y los posibles metabolitos formados.

Por otra parte, los alquilfenoles tienden a adsorberse con facilidad a los sedimentos y suelos desde donde pueden alcanzar las aguas subterráneas por lixiviación [Ying *y cols.*, 2002]. Además, su empleo en productos de uso agrícolas contribuye a una mayor presencia en estos compartimentos [Liu *y cols.*, 2010].

El hecho de que presenten cierto carácter lipofílico facilita su penetración en las membranas de los organismos vivos del medio acuático [Careri *y cols.*, 2003]. Los factores de bioconcentración (BCF) o bioacumulación (BAF), calculados dividiendo la concentración del compuesto en el ser vivo entre la concentración del mismo en el agua, son del orden de 10.000 en algas y de 3-1.300 en peces para el NP [Cox, 2003]. El 4-tOP presenta factores similares al NP, que varían entre 600 y 6000.

Debido a la baja volatilidad de estos compuestos son pocos los estudios relacionados con la calidad del aire. Sin embargo, se ha evidenciado la presencia del NP tanto en fase vapor como asociado al particulado atmosférico [Dachs *y cols.*, 1999; Salgueiro-González *y cols.*, 2013].

1.2. Bisfenol A

El bisfenol A se sintetizó por primera vez en 1905, mediante la reacción entre fenol y acetona [Rykowska *y cols.*, 2006]. Se utiliza en diferentes sectores industriales como adhesivo o componente de circuitos electrónicos y productos ignífugos. Su aplicación más destacable es como monómero en la fabricación de plásticos y polímeros sintéticos, como policarbonatos, resinas epoxi, resinas fenólicas o poliacrilatos [Gallart-Ayala *y cols.*, 2010].

El policarbonato (PC) es uno de los plásticos más utilizados debido a la excelente combinación de propiedades mecánicas, físicas y químicas (dureza, baja absorción de la humedad y buena estabilidad térmica). Así, podemos encontrar BPA en numerosos productos: bolsas de plástico, vasos y platos, implantes dentales, envases de comida y bebida, biberones de bebés, etc. [Gatidou *y cols.*, 2007]. Por otra parte, las resinas epoxi son también ampliamente utilizadas en la industria por su transparencia, resistencia mecánica y estabilidad térmica. Bolsas esterilizadoras, recubrimientos de latas de conserva, barnices de madera, tintas de impresión, material de albañilería, pinturas o aplicaciones ortopédicas, son algunos productos en cuya elaboración se utilizan las resinas epoxi [Olea Serrano *y cols.*, 2001].

Aunque este derivado fenólico se utiliza desde principios de siglo XX, es a partir del año 2000 cuando su uso crece exponencialmente; por ejemplo, en Estados Unidos, uno de los países con mayor producción de BPA, se fabricaron unas 0,78 millones de toneladas de este compuesto en 2008 [Mohapatra *y cols.*, 2010]. Por otra parte, y aunque ya en la década de los 30 se conocieron algunos efectos perjudiciales para la salud, no es hasta hace una década cuando realmente se le presta la atención que merece al descubrirse sus propiedades de alteración endocrina. Desde entonces se han llevado a cabo multitud de estudios en diferentes matrices ambientales para conocer el comportamiento de este contaminante, a fin de proteger el medio ambiente y la salud humana [Fu *y cols.*, 2010; Rykowska *y cols.*, 2006; Zhang *y cols.*, 2011]. Sin embargo, la mayoría de los estudios referentes al BPA están ligados a seguridad alimentaria debido a la posible migración de este compuesto desde los envases a los alimentos [Li *y cols.*, 2010; Maragou *y cols.*, 2006].

Cabe destacar que actualmente continúa la controversia sobre la “peligrosidad” del BPA. Si bien la Agencia Europea de Salud Alimentaria (EFSA) afirma que este compuesto no es peligroso para el medioambiente ni para la salud humana [EFSA, 2015], investigaciones científicas siguen demostrando que el BPA causa efectos adversos en los organismos [Kaur *y cols.*, 2015; Plahuta *y cols.*, 2015; Tan *y cols.*, 2015]. Por ello, es necesario realizar más estudios ecotoxicológicos y de campo

que demuestren si este compuesto es dañino o no, a fin de tomar decisiones acertadas sobre su regulación.

1.2.1. Características y propiedades físico-químicas

El bisfenol A es el nombre común por el que se conoce al 2,2-bis-(4-hidroxifenil)-propano. Su estructura química se basa en dos anillos fenólicos unidos al carbono central de la cadena de isopropilideno, como se puede ver en la Figura 3.

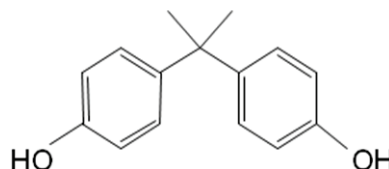


Figura 3. Estructura química del bisfenol A (2,2-bis-(4-hidroxifenil)-propano)

Las propiedades físico-químicas del BPA (Tabla 3) son, en general, comparables a las de los APs, si bien la presencia de dos grupos -OH marca la diferencia en alguna de ellas. Por ejemplo, su solubilidad es uno a dos órdenes de magnitud mayor que la de los APs. Los valores de los logaritmos de los coeficientes de partición ($\log K_{ow}$ y $\log K_{oc}$) del BPA son menores lo que justifica su menor presencia en suelos y sedimentos, así como su menor bioacumulación en organismos. El BPA es un compuesto poco volátil (constante de Henry tres órdenes de magnitud inferior a la de los APs).

Tabla 3. Propiedades físico-químicas del bisfenol A

Compuesto	Nº CAS	MW (g/mol)	Solubilidad a 25°C (mg/L)	$\log K_{ow}$	$\log K_{oc}$	Constante de Henry (atm/M)
BPA	80-05-7	228	200 ^a	3,32 ^a	3,18 ^a	4,1.10 ⁻⁹ ^b

a.[Staples *y cols.*, 1998], b.[Dachs *y cols.*, 1999]

1.2.2. Toxicología

El bisfenol A es un disruptor endocrino estrogénico que actúa sobre los receptores del 17-*beta*-estradiol (hER α y hER β), sustituyendo a la hormona natural. Al igual que en el caso de los alquilfenoles, Dods y Lawson evidenciaron la capacidad que tenía el BPA para mimetizar las hormonas femeninas realizando experimentos con ratones [Olea Serrano *y cols.*, 2001].

El BPA se considera tóxico para el medio acuático a concentraciones del orden de 1-10 mg/L [Kang *y cols.*, 2005]. En la Tabla 4 se muestran algunos valores de toxicidad asociados a este compuesto para distintas especies en agua dulce. Como se puede observar, las concentraciones a las que se producen daños en las especies son

de diez a veinte veces mayores a las obtenidas en el caso de los APs, lo que indica que la toxicidad del BPA en el medio acuático es menor.

Tabla 4. Valores de toxicidad (mg/L) del bisfenol A para distintas especies del medio acuático

Especie	Grupo taxonómico	Duración	Índice	Valor (mg/L)
<i>Pimephales promelas</i> (Raphinesque, 1820)	Peces	96 h	LC ₅₀	4,60
<i>Daphnia magna</i> (Straus, 1820)	Crustáceos	48 h	LC ₅₀	3,15
<i>Selenastrum capricornutum</i> (Printz, 1914)	Algas	96 h	EC ₅₀	2,73

LC₅₀ (concentración letal), concentración de contaminante que provoca la muerte al 50% de la población bajo estudio
 EC₅₀ (concentración efectiva), concentración de contaminante que provoca efectos negativos en el 50% de la población bajo estudio

En el caso de humanos, las alteraciones endocrinas sufridas a causa de BPA son más conocidas. La principal vía de exposición es, de nuevo, la ingestión de alimentos o agua que contienen este compuesto. Existen numerosos estudios que demuestran la presencia de BPA en estas matrices, debido posiblemente a su migración desde las paredes de los recipientes de plástico que los contienen [Perez-Palacios *y cols.*, 2012]. Un claro ejemplo de esta problemática es la surgida con los biberones en el año 2010, cuando se demostró que bebés que habían sido expuestos a BPA durante la lactancia presentaban alteraciones en el sistema hormonal. Desde entonces el uso de BPA en biberones, así como en otros artículos destinados a los más pequeños, está prohibido [Reglamento-321/2011]. Sin embargo, y como ya se ha comentado, la EFSA comunica en enero de 2015 que este EDC no supone riesgo para la salud pública (ni siquiera para aquellas personas más vulnerables) [EFSA, 2015].

1.2.3. Distribución en el medio ambiente

Este compuesto antropogénico se libera a las aguas superficiales de un modo similar al de los alquilfenoles: directamente, en distintas aplicaciones industriales como la fabricación de plásticos, resinas epoxi o en los procesos de despolimerización y reciclaje de papel [Staples *y cols.*, 1998] o a través de las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR), donde no se degrada con facilidad. Esto se debe a que se necesita alcanzar un determinado tiempo y unas condiciones adecuadas para que tenga lugar la degradación, que ocurre principalmente en condiciones aeróbicas [Poerschmann *y cols.*, 2010].

Debido a sus propiedades físico-químicas el BPA tiende a depositarse en los suelos y sedimentos y a bioacumularse en los seres vivos. Los valores de BAF de este compuesto varían entre 50-1500, menores que en el caso de los APs. Algunos autores

consideran que estos valores indican poca capacidad acumulativa, sin embargo sus efectos en los organismos dejan en entredicho esta premisa [Staples *y cols.*, 1998].

El aire es la matriz en la que menos se ha estudiado la presencia de este contaminante. El BPA no suele detectarse en el aire ambiente debido a su baja volatilidad; sin embargo, sí se ha determinado asociado al particulado atmosférico [Berkner *y cols.*, 2004; Salgueiro-González *y cols.*, 2013].

2. LEGISLACIÓN

La ubiquidad y toxicidad de estos compuestos hace necesaria su regulación a fin de proteger la salud humana y preservar el medio ambiente. En las siguientes líneas se recoge la legislación para los compuestos bajo estudio en distintos ámbitos: industrial, medioambiental y salud pública.

2.1. Normativas europeas

2.1.1. *Ámbito industrial: fabricación y comercialización*

La Directiva 76/769/CEE, de 27 de julio de 1976 ha sido durante más de 30 años la normativa base del ámbito industrial, la cual establece las consideraciones relativas a la comercialización y uso de determinadas sustancias y preparados peligrosos [Directiva-76/769]. Inicialmente esta directiva se centraba en la regulación de los bifenilos policlorados (PCB) y tras más de treinta modificaciones, llegó a considerar más de 50 familias de sustancias. Un ejemplo de estas modificaciones es la Directiva 2003/53/CE, de 18 de junio de 2003, que limita el uso del nonilfenol y sus precursores etoxilados en distintas aplicaciones como limpieza industrial, doméstica, fabricación de textil, etc.; el aditivo NP debe emplearse en concentraciones menores de 0,1% en masa de producto final [Directiva-2003/53].

En el año 2006, la Directiva 76/769/CEE y sus modificaciones fueron derogadas por el Reglamento 1097/2006, del 18 de diciembre de 2006, basado en el registro, la evaluación, la autorización y restricción de preparados químicos. Este nuevo reglamento se conoce como "REACH" (*Registration, Evaluation, Authorisation and restriction of CHemicals*) y regula la fabricación y comercialización de sustancias peligrosas en el sector industrial, obligando a establecer un control sobre las sustancias que utiliza y a adoptar medidas para prevenir y gestionar cualquier tipo de riesgo [Reglamento-1097/2006]. Además, incluye una lista de sustancias peligrosas a tener en cuenta, entre las que se incluyen los alquilfenoles (4-tOP y NP).

Existen ciertos sectores como el alimentario que debido a su relación con la salud humana presentan normativa específica. La Directiva 2002/72/CE, de 6 de agosto de 2002, regulaba los materiales y objetos de plásticos destinados a entrar en contacto con productos alimentarios; en ella se incluye el 2,2-hidroxifenil-propano (BPA) con un valor límite de migración específica de 3 mg/Kg [Directiva-2002/72].

Hoy en día, estas Directivas han sido derogadas y substituidas por el Reglamento 10/2011, de 14 de enero de 2011, que incluye más compuestos y mantiene los valores límites antes mencionados para el BPA [Reglamento-10/2011]. Es importante mencionar también el Reglamento 321/2011, de 1 de abril de 2011 que, como ya se ha comentado anteriormente, prohíbe el uso de BPA en biberones de plástico [Reglamento-321/2011].

2.1.2. *Ámbito medioambiental*

La Directiva Marco de Agua (WFD 2000/60/CE) surge en el año 2000 con el objetivo de, entre otros, alcanzar un “buen estado” ecológico y químico de las aguas superficiales y continentales de los Estados Miembros de la Unión Europea antes de 2015, preservando así la biodiversidad del medio acuático y protegiendo la salud humana [Directiva-2000/60].

Para evaluar la calidad de las aguas, la WFD establece distintos parámetros físico-químicos y biológicos que han de ser considerados como marcadores de contaminación. En lo referente a la contaminación química, en el Anexo X de la Directiva se enumera la lista de las 33 sustancias prioritarias en política de aguas que, por su ubiquidad y toxicidad, suponen un peligro para el medio acuático, como los 4-octilfenoles (4-tOP) y los 4-nonilfenoles (NP).

Es la “Directiva Hija” en política de aguas (Directiva 2008/105/CE) la que, años más tarde, establece unos valores límites denominados Normas de Calidad Ambiental (EQS) para estas sustancias prioritarias, fruto de diferentes estudios ecotoxicológicos a corto y largo plazo [Directiva-2008/105]. Estos EQS se expresan mediante dos parámetros: la media anual (AA) y la concentración máxima admisible (MAC). En algunos casos, la MAC no se aplica pues se considera que los valores fijados por la AA son lo bastante bajos para proteger el medio acuático a corto plazo. Por otra parte, y para cada sustancia prioritaria, los EQS se establecen diferenciando dos grupos de aguas: 1) las aguas superficiales continentales que incluyen ríos, lagos y masas de agua artificiales y 2) otras aguas superficiales. Además, en el Anexo III se recoge un grupo de posibles sustancias que podrían ser consideradas como contaminantes prioritarios en un futuro, entre las que se encuentra el BPA.

Desde entonces, el “buen estado químico” de las aguas se evalúa comparando las concentraciones de los contaminantes en las aguas analizadas con el EQS correspondiente. De esta manera, si se superan los valores establecidos en la legislación no se puede garantizar la protección del medio acuático. Sin embargo, el avance en los estudios eco-toxicológicos y medioambientales ha puesto de manifiesto la necesidad de modificar los valores límite de algunas sustancias existentes, así como añadir otras sustancias que antes no estaban consideradas.

La Directiva 2013/39/UE, que modifica a las antes mencionadas, incluye nuevos contaminantes (hasta un total de 45 sustancias prioritarias) y hace más restrictivas los valores límite en aguas para algunos compuestos [Directiva-2013/39].

En el caso de los APs, los EQS se mantienen con respecto a la Directiva anterior (Tabla 5). Sin embargo, la nueva Directiva considera la mezcla técnica de nonilfenol (NP, N°CAS. 84852-15-3) como elemento representativo, y no el isómero lineal (4-*n*-NP) como se mencionaba en la Directiva 2008/105/EC. Por su parte, el BPA, contemplado en la Directiva anterior como futura sustancia prioritaria, no se incluye dentro de las 45 nuevas sustancias prioritarias ni se considera en la correspondiente “lista de observación”. En cualquier caso, estudios recientes demuestran su toxicidad y ubiquidad en el medio ambiente [Myridakis *y cols.*, 2015; Rajakumar *y cols.*, 2015]. Por ello, se considera necesario estudiar con mayor profundidad el comportamiento de este compuesto, a fin de tomar una decisión acertada sobre su inclusión en la política de aguas.

Tabla 5. Valores medios anuales (AA) y concentración máxima admisible (MAC) en µg/L, fijados en la Directiva 2013/39/UE

Compuesto	N°CAS	Aguas superficiales continentales		Otras aguas superficiales	
		AA	MAC	AA	MAC
Nonilfenol (Nonilfenol)	84852-15-3	0,3 ^a	2,0 ^b	0,3 ^a	2,0 ^b
Octilfenol (4- <i>tert</i> -Octilfenol)	140-66-9	0,1 ^c	No aplicable	0,01 ^d	No aplicable

^a. Calculado como el cociente entre el EC50 de la especie más sensible a la que se observan efectos a largo plazo (*Scenedesmus subspicatus*, Chodat, 1926. EC₅₀=0,33 µg/L) y un factor de corrección de 10

^b. Calculado como el cociente entre el EC50 de la especie más sensible a la que se observan efectos a corto plazo (*Hyalella azteca*, Saussure, 1858. EC₅₀=0,0207 mg/L) y un factor de corrección de 100

^c. Calculado como el cociente entre el EC50 de la especie más sensible a la que se observan efectos a largo plazo (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792. PNEC=6,1 µg/L) y un factor de corrección de 50

^d. Calculado como el cociente entre el EC50 de la especie más sensible a la que se observan efectos a largo plazo (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792. PNEC=6,1 µg/L) y un factor de corrección de 500

Por otra parte, la WFD en general y la Directiva Marco sobre la Estrategia Marina (MSFD, Directiva 2008/56/EC) en particular, muestran la necesidad de llevar a cabo programas de control y monitorización ambiental para asegurar la calidad de las aguas a lo largo del tiempo, permitiendo tomar medidas de protección en el caso de ser necesarias [Directiva-2008/56]. Por ello, además de métodos analíticos sensibles y selectivos que permitan alcanzar los bajos límites establecidos en la legislación (ng/L), sería aconsejable disponer de metodología simple, rápida y que requiera poco volumen de muestra, facilitando el muestreo, transporte y conservación en los programas de monitorización. Igualmente, esta metodología analítica ha de cumplir los requisitos establecidos en la Directiva 2009/90/CE, de 31 de julio de 2009, relativa a las especificaciones técnicas del análisis químico y seguimiento de las aguas. En ella se establece que la incertidumbre del método ha de ser inferior al 50% y los límites de cuantificación menores del 30% del valor del EQS establecido, entre otros aspectos [Directiva-2009/90].

Además de analizar las aguas, el estado del medio acuático puede evaluarse estudiando la presencia de las sustancias prioritarias en sedimento y/o biota. La

elección de una u otra matriz complementaria dependerá de las propiedades físico-químicas de los compuestos bajo estudio [European-Commission, 2010]. Existen guías técnicas sobre la implementación de los EQS que recomiendan la monitorización de algunas de las sustancias peligrosas en sedimentos, como es el caso de los APs [European-Commission, 2011]; sin embargo la Directiva 2013/39/UE no recoge valores límite para esta matriz. Sí incluye los EQS en biota para algunos compuestos, aunque tampoco es el caso de los compuestos considerados en esta memoria, posiblemente por la falta de datos científicos sobre su comportamiento y bioacumulación en organismos vivos. En cualquier caso, existen otros documentos previos que han propuesto valores límite para estas y otras matrices, también en base a estudios eco-toxicológicos [European-Commission, 2005a, b]. En la Tabla 6 se muestran estos valores para los APs.

Tabla 6. Valores límite propuestos para alquilfenoles en sedimento, biota y alimentos en peso seco (dw) y peso húmedo (ww) [European-Commission, 2005a, b]

Campo de aplicación	4-tOP	NP
<i>Sedimentos (agua dulce)</i>	7,4 µg/kg (ww)	39 µg/kg (ww)
<i>Sedimentos (agua mar)</i>	3,4 µg/kg (dw)	180 µg/kg (dw)
<i>Cadena trófica</i>	10 mg/kg (ww)	
<i>Alimentos ingeridos por seres humanos</i>	8,7 mg/kg (ww)	

2.1.3. Salud pública

La principal vía de exposición a alquilfenoles y bisfenol A es, como ya se ha comentado, la ingestión de agua o alimentos que presenten estos compuestos. Teniendo en cuenta estudios toxicológicos, algunos organismos oficiales han establecido valores de ingesta diaria tolerable (TDI) para los EDCs, definida como cantidad de contaminante presente en alimentos o agua de bebida que puede ser ingerida todos los días durante toda la vida sin que suponga riesgos apreciables para la salud [EFSA, 2013]. De esta manera se mantiene un margen suficiente de seguridad para los consumidores, incluidos aquellos subgrupos más sensibles, como los niños. La EFSA establece un límite de 0,05 mg/kg de peso corporal para el bisfenol A. Por otra parte, el Instituto de Seguridad y Toxicología de Dinamarca ha propuesto un valor de TDI de 300 µg por adulto y día para el NP, para un adulto de 60 kg. No existe valor de TDI para el 4-tOP, pero se ha estimado en trabajos previos en base a estudios toxicológicos (600 µg por adulto y día) [Ferrara *y cols.*, 2008].

2.2. Normativas nacionales

Parte de la legislación europea antes mencionada ha sido incorporada al ordenamiento jurídico a nivel nacional y/o autonómico. En la Tabla 7 se muestran las correspondencias, indicando de nuevo el ámbito al que pertenece cada normativa.

Tabla 7. Legislación española y/o gallega relacionada con los compuestos bajo estudio

Legislación europea		Legislación Española	
Directiva	Observaciones	Normativa	Ref
<i>Ámbito industrial</i>			
76/769/CEE	Limita comercialización y uso de sustancias peligrosas	Real Decreto 1406/1989, de 10 de noviembre, por el que se imponen limitaciones a la comercialización y al uso de ciertas sustancias y preparados peligrosos	[RD-1406/1989]
2003/53/CE	Nonilfenol, nonilfenol etoxilados y cemento	Orden PRE/1954/2004, de 22 de junio, por la que se modifica el Anexo I del Real Decreto 1406/1989	[Orden-1954/2004]
Reglamento 1097/2006	Registro, evaluación, autorización y restricción de sustancias y preparados químicos (REACH)	Real Decreto 1802/2008, de 3 de noviembre, por el que se modifica el Reglamento sobre notificación de sustancias nuevas y clasificación, envasado y etiquetado de sustancias peligrosas, aprobado por el Real Decreto 363/1995, de 10 de marzo, con la finalidad de adaptar disposiciones al Reglamento 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo (REACH)	[RD-1802/2008]
2002/72/CE	Materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con productos alimentarios	Real Decreto 866/2008, de 23 de mayo, por el que se aprueba la lista de sustancias permitidas para la fabricación de materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con los alimentos y se regulan determinadas condiciones de ensayo	[RD-866/2008]
		Real Decreto 874/2011, de 17 de junio, por el que se establece la lista positiva de sustancias permitidas para la fabricación de materiales poliméricos destinados a entrar en contacto con alimentos	[RD-874/2011]
<i>Ámbito medioambiental</i>			
2000/60/CE 2008/105/CE	Control de contaminantes en política de aguas. Valores límite	Real Decreto 60/2011 de 21 de enero, sobre normas de calidad ambiental en el ámbito de política de aguas Ley 9/2010, de 4 de noviembre, de aguas de Galicia	[RD-60/2011] [Ley-09/2010]
2008/56/CE	Control del medio marino	Ley 41/2010, de 29 de diciembre, de protección del medio marino	[Ley-41/2010]

Bibliografía

- Benijts, T., Lambert, W., De Leenheer, A. *Analysis of multiple endocrine disruptors in environmental waters via wide-spectrum solid-phase extraction and dual-polarity ionization LC-ion trap-MS/MS*, Anal Chem (2004) 76, 704-711.
- Berkner, S., Streck, G., Herrmann, R. *Development and validation of a method for determination of trace levels of alkylphenols and bisphenol A in atmospheric samples*, Chemosphere (2004) 54, 575-584.
- Boehme, R.M., Andries, T., Doetz, K.H., Thiele, B., Guenther, K. *Synthesis of defined endocrine-disrupting nonylphenol isomers for biological and environmental studies*, Chemosphere (2010) 80, 813-821.
- Careri, M., Elviri, L., Mangia, A., Zagnoni, I. *Liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry and liquid chromatography with fluorescence detection for determination of octylphenol and nonylphenol in municipal wastewater at trace levels*, Chromatographia (2003) 57, 321-327.
- Cox, C. *Nonyl phenol and related chemicals*, J Pesticide Reform (2003) 16, 15-20.
- Dachs, J., Van Ry, D.A., Eisenreich, S.J. *Occurrence of Estrogenic Nonylphenols in the Urban and Coastal Atmosphere of the Lower Hudson River Estuary*, Environ Sci Technol (1999) 33, 2676-2679.
- DEFRA, *4-tert-Octylphenol. Risk reduction strategy and analysis of advantages and drawbacks*, Department for Environment, Food and Rural Affairs (2008).
- Directiva 76/769/CEE del Consejo de 27 de julio de 1976 relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados miembros que limitan la comercialización y el uso de determinadas sustancias y preparados peligrosos. DOCE, L 262/201.
- Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 23 de octubre de 2000 por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas. DOCE, L 327/1.
- Directiva 2002/72/CE de la Comisión de 6 de agosto de 2002 relativa a los materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios. DOCE, L 220/18.
- Directiva 2003/53/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 18 de junio de 2003, por la que se modifica por vigésimosexta vez la Directiva 76/769/CEE del Consejo respecto a la limitación y comercialización y el uso de determinadas sustancias y preparados peligrosos (nonilfenol, etoxilados del nonilfenol y cemento). DOUE, L 178/24.
- Directiva 2008/56/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 17 de junio de 2008 por la que se establece un marco de acción comunitaria para la política del medio marino (Directiva Marco sobre la Estrategia Marina). DOUE, L 164/19.
- Directiva 2008/105/CE del Parlamento y del Consejo de 16 de diciembre de 2008 relativa a las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas, por la que se modifican y derogan ulteriormente las Directivas 82/176/CEE, 83/513/CEE, 84/156/CEE, 84/491/CEE y 86/280/CEE del Consejo, y por la que se modifica la Directiva 2000/60/CE. DOUE, L 348/84.
- Directiva 2009/90/CE de la Comisión del 31 de julio de 2009 por la que se establecen, de conformidad con la Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, las especificaciones técnicas del análisis químico y del seguimiento del estado de las aguas. DOUE, L 201/36.

- Directiva 2013/39/UE del Parlamento Europeo y del Consejo de 12 de agosto de 2013 por la que se modifican las Directivas 2000/60/CE y 2008/105/CE en cuanto a las sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas. DOUE, L 226/1.
- Dodds, E.C., Lawson, W. *Molecular structure in relation to oestrogenic activity. Compounds without a phenanthrene nucleus*, Proc Royal Soc Lon B (1938) 125, 222-232.
- EFSA, European Food Safety Authority (2013). www.efsa.europa.eu/en/faqs/faqschemicalsinfood.htm
- EFSA, European Food Safety Authority (2015). www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub3978.htm
- Common Implementation Strategy for the Water Framework Directive. Environmental Quality Standards, Substance Data sheet (25): octylphenol (para-tert-octylphenol), 2005.
- Common Implementation Strategy for the Water Framework Directive. Environmental Quality Standards (EQS). Substance Data sheet (24): Nonylphenols and 4-Nonylphenol, 2005.
- Technical Report: Common Implementation Strategy for the Water Framework Directive (2000/60/EC). Guidance n°25 on chemical monitoring of sediment and biota under Water Framework Directive.
- Technical Report: Common Implementation Strategy for Water Framework Directive (2000/60/EC). Guidance n°27 for deriving Environmental Quality Standards.
- Ferrara, F., Ademollo, N., Delise, M., Fabietti, F., Funari, E. *Alkylphenols and their ethoxylates in seafood from the Tyrrhenian Sea*, Chemosphere (2008) 72, 1279-1285.
- Fu, P., Kawamura, K. *Ubiquity of bisphenol A in the atmosphere*, Environ Pollut (2010) 158, 3138-3143.
- Gallart-Ayala, H., Moyano, E., Galcerán, M.T. *On-line solid phase extraction fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of bisphenol A and its chlorinated derivatives in water samples*, J Chromatogr A (2010) 1217, 3511-3518.
- Gatidou, G., Thomaidis, N.S., Stasinakis, A.S., Lekkas, T.D. *Simultaneous determination of the endocrine disrupting compounds nonylphenol, nonylphenol ethoxylates, triclosan and bisphenol A in wastewater and sewage sludge by gas chromatography-mass spectrometry*, J Chromatogr A (2007) 1138, 32-41.
- Kang, J.H., Kondo, F. *Bisphenol A degradation in seawater is different from that in river water*, Chemosphere (2005) 60, 1288-1292.
- Kaur, K., Simon, A.F., Chauhan, V., Chauhan, A. *Effect of bisphenol A on Drosophila melanogaster behaviour - A new model for the studies on neurodevelopmental disorders*, Behav Brain Res (2015) 284, 77-84.
- Ley 9/2010, de 4 de noviembre, de aguas de Galicia. DOG, n° 222.
- Ley 41/2010, de 29 de diciembre, de protección de medio marino. BOE, n° 317.
- Li, X., Ying, G.-G., Su, H.-C., Yang, X.-B., Wang, L. *Simultaneous determination and assessment of 4-nonylphenol, bisphenol A and triclosan in tap water, bottled water and baby bottles*, Environ Int (2010) 36, 557-562.
- Liu, Y., Guan, Y.T., Tam, N.F.Y., Mizuno, T., Tsuno, H., Zhu, W.P. *Influence of Rainfall and Basic Water Quality Parameters on the Distribution of Endocrine-Disrupting Chemicals in Coastal Area*, Water Air Soil Pollut (2010) 209, 333-343.
- Loos, R., Wollgast, J., Castro-Jimenez, J., Mariani, G., Huber, T., Locoro, G., Hanke, G., Umlauf, G., Bidoglio, G., Hohenblum, P., Moche, W., Weiss, S., Schmid, H., Leiendecker, F., Ternes, T., Ortega, A.N., Hildebrandt, A., Barcelo, D., Lepom, P., Dimitrova, I.,

- Nitcheva, O., Polesello, S., Valsecchi, S., Boutrup, S., Sortkjaer, O., de Boer, R., Staeb, J. *Laboratory intercomparison study for the analysis of nonylphenol and octylphenol in river water*, TrAC-Trends Anal Chem (2008) 27, 89-95.
- Loyo-Rosales, J.E., Rosales-Rivera, G.C., Lynch, A.M., Rice, C.P., Torrents, A. *Migration of nonylphenol from plastic containers to water and a milk surrogate*, J Agric Food Chem (2004) 52, 2016-2020.
- Maragou, N.C., Lampi, E.N., Thomaidis, N.S., Koupparis, M.A. *Determination of bisphenol A in milk by solid phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry*, J Chromatogr A (2006) 1129, 165-173.
- Martínez, E., Gans, O., Weber, H., Scharf, S. *Analysis of nonylphenol polyethoxylates and their metabolites in water samples by high-performance liquid chromatography with electrospray mass spectrometry detection*, Water Sci Technol (2004) 50, 157-163.
- Mohapatra, D.P., Brar, S.K., Tyagi, R.D., Surampalli, R.Y. *Physico-chemical pre-treatment and biotransformation of wastewater and wastewater sludge - Fate of bisphenol A*, Chemosphere (2010) 78, 923-941.
- Mueller, G.C., Kim, U.H. *Displacement of estradiol from estrogen receptors by simple alkylphenols*, Endocrin (1978) 102, 1429-1435.
- Myridakis, A., Fthenou, E., Balaska, E., Vakinti, M., Kogevinas, M., Stephanou, E. *Phthalate esters, parabens and bisphenol-A exposure among mothers and their children in Greece (Rhea cohort)*, Environ Int (2015) 531, 1-10.
- Olea Serrano, N., Fernández Cabrera, M.F., Martín Olmgeo, P. *Disruptores endocrinos. El caso particular de los xenobióticos estrogénicos II. Estrogénicos sintéticos*, Salud Ambiental (2001) 1, 64-72.
- Orden Pre/1954/2004, de 22 de junio, por la que se modifica el Anexo I del Real Decreto 1406/1989. Nonilfenol, nonilfenol etoxilados y cemento.
- Perez-Palacios, D., Angel Fernandez-Recio, M., Moreta, C., Teresa Tena, M. *Determination of bisphenol-type endocrine disrupting compounds in food-contact recycled-paper materials by focused ultrasonic solid-liquid extraction and ultra performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry*, Talanta (2012) 99, 167-174.
- Plahuta, M., Tisler, Y., Pintar, A., Toman, M.J. *Adverse effects of bisphenol A on water louse (Asellus aquaticus)*, Ecotox Environ Safe (2015) 117, 81-88.
- Poerschmann, J., Trommler, U., Gorecki, T. *Aromatic intermediate formation during oxidative degradation of Bisphenol A by homogeneous sub-stoichiometric Fenton reaction*, Chemosphere (2010) 79, 975-986.
- Quintana, J.B., Rodil, R., Muniategui-Lorenzo, S., López-Mahía, P., Prada-Rodríguez, D. *Multiresidue analysis of acidic and polar organic contaminants in water samples by stir-bar sorptive extraction-liquid desorption-gas chromatography-mass spectrometry*, J Chromatogr A (2007) 1174, 27-39.
- Rajakumar, C., Guan, H., Langlois, D., Cernea, M., Yang, K. *Bisphenol A disrupts gene expression in human placental trophoblast cells*, Reprod Toxicol (2015) 53, 39-44.
- Real Decreto 60/2011, de 21 de enero, sobre las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas. BOE, nº 19.
- Real Decreto 866/2008, de 23 de mayo, por el que se aprueba la lista de sustancias permitidas para la fabricación de materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con los alimentos y se regulan determinadas condiciones de ensayo. BOE, nº 131.

- Real Decreto 874/2011, de 17 de junio, por el que se establece la lista positiva de sustancias permitidas para la fabricación de materiales poliméricos destinados a entrar en contacto con los alimentos. BOE, nº 164.
- Real Decreto 1406/1989, de 10 de noviembre, por el que se imponen limitaciones a la comercialización y al uso de ciertas sustancias y preparados peligrosos. BOE, nº 178.
- Real Decreto 1802/2008, de 3 de noviembre, por el que se modifica el Reglamento sobre notificación de sustancias nuevas y clasificación, envasado y etiquetado de sustancias peligrosas, aprobado por el Real Decreto 363/1995, de 10 de marzo, con la finalidad de adaptar disposiciones al Reglamento 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo (Reglamento REACH). BOE, nº 266.
- Reglamento 10/2011 de la Comisión de 14 de enero de 2011 sobre materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos. DOUE, L 12/1.
- Reglamento de Ejecución (UE) Nº 321/2011 de la Comisión de 1 de abril de 2011 que modifica el Reglamento (UE) nº 10/2011 por lo que respecta a la restricción del uso del bisfenol A en biberones de plástico para lactantes. DOUE, L 87/1.
- Reglamento (CE) Nº1097/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo de 18 de diciembre de 2006 relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos (REACH), por el que se crea la Agencia Europea de Sustancias y Preparados Químicos, se modifica la Directiva 1999/45/CE y se derogan el Reglamento (CEE) nº 793/93 del Consejo y el Reglamento (CE) nº 1488/94 de la Comisión, así como la Directiva 76/769/CEE del Consejo y las Directivas 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE y 2000/21/CE de la Comisión. DOUE, L 136/3.
- Rykowska, I., Wasiak, W. *Properties, threats, and methods of analysis of bisphenol A and its derivatives*, Acta Chromatogr (2006) 16, 7-27.
- Salgueiro-González, N., López de Alda, M., Muniategui-Lorenzo, S., Prada-Rodríguez, D., Barceló, D. *Determination of 13 estrogenic endocrine disrupting compounds in atmospheric particulate matter by pressurised liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry*, Anal Bioanal Chem (2013) 405, 8913-8923.
- Schmitz-Afonso, I., Loyo-Rosales, J.E., Avilés, M.D., Rattner, B.A., Rice, C.P. *Determination of alkylphenol and alkylphenol ethoxylates in biota by liquid chromatography with detection by tandem mass spectrometry and fluorescence spectroscopy*, J Chromatogr A (2003) 1010, 25-35.
- Staples, C., Dorn, P., Klecka, G., S., O.B., Harris, L. *A review of the environmental fate, effects and exposures of bisphenol A*, Chemosphere (1998) 36, 2149-2173.
- Tan, L., Wang, S., Wang, Y., He, M., Li, D. *Bisphenol A exposure accelerated the aging process in the nematode *Caenorhabditis elegans**, Toxicol Lett (2015) 235, 75-83.
- Warhust, M., *A Environmental Assessment of Alkylphenol Ethoxylates and Alkylphenols*, Friends of the Earth (1995).
- Ying, G.G., Williams, B., Kookana, R. *Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates - a review*, Environ Int (2002) 28, 215-226.
- Zhang, X., Gao, Y., Li, Q., Li, G., Guo, Q., Yan, C. *Estrogenic Compounds and Estrogenicity in Surface Water, Sediments, and Organisms from Yundang Lagoon in Xiamen, China*, Arch Environ Contamin Toxicol (2011) 61, 93.

CAPÍTULO II. Técnicas analíticas



- *Ventajas de la cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a la espectrometría de masas en tándem para la determinación de alquilfenoles y bisfenol A*
- *Selección de técnicas de extracción que cumplen con principios de la Química Analítica Verde. Fundamento y aplicación*
- *Aseguramiento de la calidad de métodos analíticos y problemas de contaminación de blancos asociados a los compuestos bajo estudio*

Publicaciones científicas

“Analytical methodologies for the determination of alkylphenols and bisphenol A in water, sediment and biota samples: a review”. N.Salgueiro-González y cols. *En fase de redacción*

Los análisis medioambientales de disruptores endocrinos están limitados, en numerosas ocasiones, por la metodología analítica disponible para su determinación. Para alcanzar las bajas concentraciones a las que estos compuestos se encuentran en el medio acuático se necesitan métodos de elevada sensibilidad y selectividad, con una etapa de extracción/preconcentración rápida, sencilla y que no requiera gran cantidad de muestra. Además, debido a la complejidad de alguna de las matrices, como sedimentos o biota, se requieren etapas de purificación posteriores, que en muchas ocasiones son tediosas. Por ello, el desarrollo de nueva y eficiente metodología analítica que presente estos requisitos es indispensable para el estudio ambiental de estos contaminantes.

En este Capítulo se describe el fundamento de las técnicas analíticas seleccionadas en esta memoria para el análisis de alquilfenoles y bisfenol A en agua, sedimento y biota. Se enumeran también las ventajas e inconvenientes de cada una de ellas con respecto a las ya propuestas en la bibliografía, recogidas de manera esquemática en los apartados correspondientes. Finalmente se comentan las pautas generales a seguir para el aseguramiento de la calidad de los métodos analíticos propuestos, tanto en la optimización como en el estudio de validación y su posterior aplicación a muestras.

1. DETERMINACIÓN INSTRUMENTAL

Las técnicas cromatográficas son, sin duda, las más utilizadas para la determinación de los compuestos bajo estudio. La cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID) y la cromatografía de líquidos con detector de fluorescencia (HPLC-FLD) y/o ultravioleta-visible (HPLC-UV/Vis) han sido empleadas en el análisis de los APs y el BPA. Si bien estos detectores son sensibles y válidos para la detección de estos EDCs, requieren preparaciones de muestra tediosas para eliminar las interferencias presentes en matrices complejas [Martínez *y cols.*, 2004].

A fin de reducir los tiempos de análisis y simplificar los procedimientos experimentales, estos detectores han sido reemplazados por el espectrómetro de masas, un detector universal para todo tipo de analitos, de alta sensibilidad, específico y de rápida respuesta. De hecho, la cromatografía de gases y la de líquidos acopladas a la espectrometría de masas (GC-MS y LC-MS) son las técnicas seleccionadas en la mayoría de las aplicaciones [Fiamegos *y cols.*, 2007].

En general, la GC-MS es la técnica elegida para el análisis de EDCs debido a su mayor poder de resolución; no obstante, los resultados obtenidos no son siempre satisfactorios. Esta técnica solamente es aplicable a compuestos volátiles y semivolátiles, con bajos pesos moleculares (<1000 g/mol), estables a la temperatura de trabajo y preferentemente con baja polaridad. Teniendo en cuenta estas limitaciones,

se espera una deficiente separación de los APs y BPA por GC-MS, con picos pobres y asimétricos debido a su baja volatilidad y su polaridad media [Martínez *y cols.*, 2004].

Para solucionar este problema muchos autores deciden llevar a cabo una derivatización, etapa en la que se modifica químicamente el analito para dar lugar a un derivado con nuevas propiedades que faciliten su determinación por GC-MS; en el caso de estos EDCs se pretende sustituir los grupos -OH presentes en su estructura. Existen diferentes estrategias de derivatización que pueden ser empleadas para tal fin dependiendo del analito de interés y de la técnica de extracción utilizada: alquilación, acilación y silanización son algunas de ellas [Quintana *y cols.*, 2007]. Si bien se han empleado las tres técnicas para la determinación de estos EDCs, la silanización es la más frecuente y se utilizan como agentes derivatizantes la N-Metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (MSTFA) y la bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSTFA) [Ahn *y cols.*, 2007; Gatidou *y cols.*, 2007]

Aunque la derivatización permite mejorar la separación de los compuestos dando lugar a una mayor resolución de picos y aumento de la sensibilidad, tiene también sus desventajas. En primer lugar, se aumenta el tiempo de análisis y se pueden producir pérdidas de analito al incorporar una nueva etapa en el tratamiento de muestra. Otros inconvenientes son los altos niveles de fondo que aumentan el riesgo de contaminación y la sobreestimación de la concentración de los compuestos [Kawaguchi *y cols.*, 2004].

Un problema particular de la GC-MS se centra en la determinación de la mezcla técnica NP, en la que se obtiene un gran número de picos de difícil diferenciación correspondientes a los distintos isómeros de la mezcla, dando lugar a una incorrecta cuantificación de este compuesto [Martínez *y cols.*, 2004].

Por todo lo anteriormente comentado, se recurre cada vez más a la LC-MS. Aunque esta técnica a veces se relaciona con una baja resolución y un importante efecto matriz, estos inconvenientes pueden solucionarse utilizando un detector adecuado, como es el espectrómetro de masas [Kawaguchi *y cols.*, 2004]. A diferencia de la GC-MS, la LC-MS es adecuada para la determinación de analitos polares no iónicos y solubles en agua [Careri *y cols.*, 2003], como ocurre con los APs y el BPA. Además, la elevada sensibilidad, selectividad, robustez y los bajos límites de detección obtenidos [Gallart-Ayala *y cols.*, 2010b] le confieren una amplia aplicabilidad en diferentes campos como el alimentario, el farmacéutico o el bioquímico, entre otros.

En ocasiones, la selectividad y sensibilidad proporcionadas por la espectrometría de masas no son suficientes para la determinación de compuestos a bajas concentraciones en matrices complejas y entonces se recurre a la espectrometría de masas en tándem (MS/MS). En este caso, se obtienen dos o más fragmentaciones de los iones, lo que permite conocer varias transiciones características de cada analito, ayudando a la identificación y cuantificación de los compuestos, incluso de los compuestos no conocidos (*non-target compounds*) [Benijts *y cols.*, 2004b]. Estas ventajas

hacen que la técnica de LC-MS/MS sea la idónea para los análisis medioambientales, como los llevados a cabo en esta memoria.

1.1. Cromatografía de líquidos de alta resolución

A la hora de utilizar un sistema de cromatografía de líquidos (Figura 4) hay que tener en cuenta distintos factores que pueden condicionar la separación e influir en la respuesta obtenida, como los disolventes de la fase móvil, el uso de modificadores en dicha fase, el tipo de columna (fase estacionaria), la temperatura, etc.

La separación cromatográfica de los APs y el BPA se lleva a cabo en fase inversa (o reversa), en la que la fase estacionaria es apolar y la fase móvil es más polar. De esta manera los compuestos se separan según la hidrofobicidad de la cadena carbonada, eluyendo antes los compuestos más polares. Esto permite diferenciar los compuestos con distinto número de átomos de carbono en la cadena alquílica (es decir, los 4-octilfenoles de los 4-nonilfenoles), así como los isómeros lineales de los ramificados (los lineales eluyen más tarde, pues son menos polares). Por otra parte, y a diferencia de la GC-MS, se obtiene un único pico correspondiente a la mezcla técnica del NP, aumentando la sensibilidad del análisis y facilitando su cuantificación [López de Alda *y cols.*, 2003].

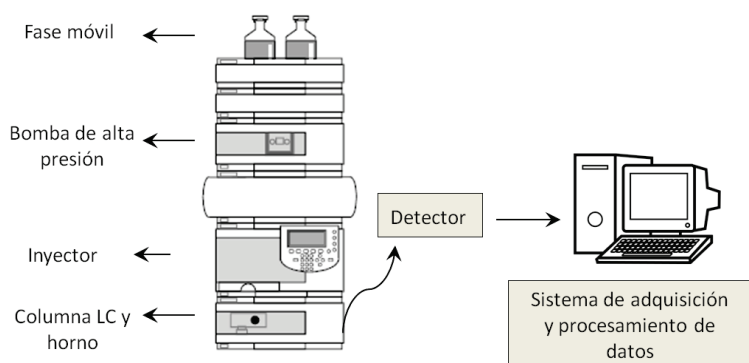


Figura 4. Esquema general de un cromatógrafo de líquidos

Como fase estacionaria destaca el octadecilsilano (C_{18}) y el octilsilano (C_8) mientras que como fase móvil se usa una mezcla de disolventes de agua con uno o varios disolventes orgánicos polares, que suelen ser acetonitrilo y/o metanol. En cuanto a las condiciones de la elución, se prefiere la elución en gradiente a la isocrática, pues permite reducir el tiempo de análisis cuando se pretende determinar compuestos de polaridades diferentes.

Cabe destacar también el uso de modificadores de fase móvil, con el fin de mejorar la separación cromatográfica y/o aumentar la señal emitida por el detector (sobre todo en el caso de la espectrometría de masas). En el análisis de APs y BPA se han empleado pequeños volúmenes de ácidos débiles como acético y fórmico [Brossa *y cols.*, 2004; Petrovic *y cols.*, 2002a], sales como acetato amónico [Jahnke *y cols.*, 2004;

Loyo-Rosales *y cols.*, 2003] y bases como amoníaco [Iparraguirre *y cols.*, 2014; Salgueiro-González *y cols.*, 2012].

En cuanto a la temperatura, se requiere la termostatación de la columna para asegurar la reproducibilidad de los resultados. Generalmente se utilizan temperaturas ligeramente superiores a la temperatura ambiente (30-40°C), de manera que ayude a la difusión de la fase móvil a través de la columna proporcionando una mejor separación.

1.2. Espectrometría de masas: fuente de ionización y analizador de masas

Un espectrómetro de masas se compone de tres partes fundamentales, mostradas en la Figura 5: fuente de ionización (ioniza las moléculas de analito tras eliminar la fase móvil), analizador de masas (separa los iones tras aplicar un vacío que permita su movimiento) y detector (emite la señal correspondiente y permite su registro en el ordenador a tiempo real). La gran variedad de cada una de ellas aporta a esta técnica una gran versatilidad.

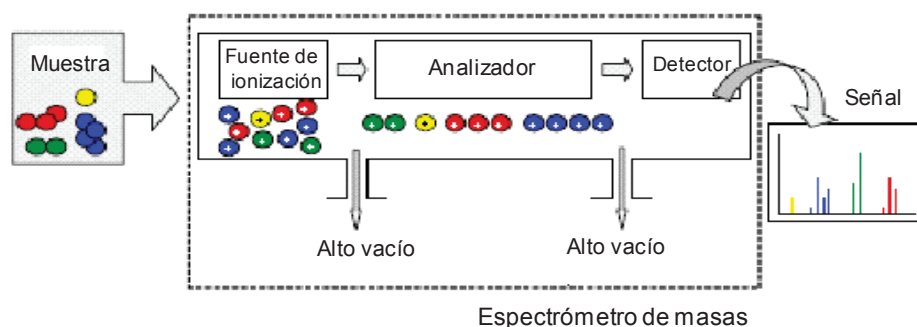


Figura 5. Esquema general de un espectrómetro de masas

1.2.1. Técnicas de ionización

Dado que la determinación en el espectrómetro de masas se lleva a cabo en fase gas es necesaria una fuente de ionización que permita la eliminación de la fase móvil, evitando la formación de clústeres que pueden afectar a la señal obtenida [Boyd *y cols.*, 2008]. Existen diferentes técnicas de ionización para lograr este objetivo: bombardeo de átomos a gran velocidad (FAB), espectrometría de masas de iones secundarios (SIMS), ionización por termonebulización (TS), desorción de la matriz asistida por láser (MALDI) e ionización a presión atmosférica (API) [Cole, 1997].

Hoy en día, las técnicas API son las más utilizadas para los análisis mediante LC-MS, pues permiten una ionización suave de un gran número de compuestos; es decir, no producen demasiadas fragmentaciones del analito durante su ionización. Esto es una gran ventaja cuando se quieren determinar compuestos de alto peso molecular (>2000 Da), pero también es muy efectivo para moléculas de bajo peso molecular. El principal inconveniente es el efecto matriz que puede aumentar o

disminuir la señal afectando también a la reproducibilidad de los resultados [Benijts y cols., 2004a].

Se diferencian tres tipos de técnicas de ionización a presión atmosférica: ionización química a presión atmosférica (APCI), fotoionización a presión atmosférica (APPI) e ionización con electrospray (ESI). La elección de una u otra técnica se basa en las propiedades físico-químicas de los compuestos que se quieren determinar. En la Figura 6 se muestra como ESI es la técnica más versátil, aplicable a analitos de polaridad media-baja a alta y de gran peso molecular. Por su parte APCI y APPI se aplican para la determinación de moléculas más pequeñas y menor polaridad, sobre todo en el caso de APPI, que permite analizar moléculas apolares.

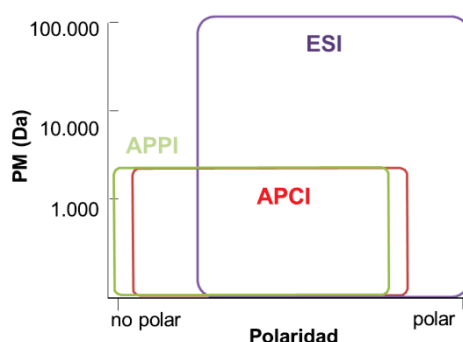


Figura 6. Aplicabilidad de las distintas técnicas de ionización en función de los compuestos bajo estudio

Aunque el mecanismo de ionización es distinto en las tres técnicas, en todas ellas se aplica un potencial y una temperatura elevada que ayuda a la formación de los iones. El voltaje aplicado puede ser positivo o negativo en función del comportamiento de los compuestos durante el proceso de ionización (principalmente su afinidad protónica, que viene dada por los grupos funcionales presentes en su estructura química).

Se habla de *ionización en modo positivo* e *ionización en modo negativo* para cada una de las técnicas, representándose con (+) ó (-) respectivamente. El primer caso se utiliza con compuestos que presentan grupos básicos con gran afinidad protónica (-OR, -COOR, etc.) que tienden a captar un protón y cargarse positivamente; el segundo, con compuestos que presentan grupos ácidos con baja afinidad protónica (-OH, -CO₂H, -NH₂), que tienden a perder un protón, cargándose negativamente. Los APs y el BPA pertenecen a este último grupo, por lo que la ionización se suele llevar a cabo en modo negativo (APCI (-), ESI (-)).

Como en el caso de la GC-MS, puede llevarse a cabo una derivatización de los compuestos de interés de manera que se puedan ionizar en un modo distinto al que le correspondería según sus propiedades. Lien y cols. han llevado a cabo un estudio comparativo entre las distintas técnicas de ionización API, los posibles modos de ionización y el uso de agentes derivatizantes (derivados dansilados) en el caso de los alquilfenoles [Lien y cols., 2009]. El resultado obtenido es que ESI (-) es la mejor técnica

para la ionización de estos compuestos. Teniendo en cuenta lo antes comentado, en esta memoria se utiliza ESI (-) como técnica de ionización.

✓ Ionización con electrospray (ESI)

Esta técnica fue desarrollada por Yamashita y Fenn en 1988 [Gross, 2004]. Desde entonces su importancia ha ido en aumento y hoy en día es una de las técnicas más utilizadas para la determinación de bajas concentraciones de analitos orgánicos en muestras líquidas con disolventes polares. Prueba de su importancia es que su descubridor, J.B.Fenn, recibió el Premio Nobel de Química en el 2002.

En términos generales, ESI se basa en la formación de un aerosol al aplicar un campo eléctrico elevado, que finalmente da lugar a iones en fase gas mediante la evaporación del disolvente, todo ello a presión atmosférica. Inicialmente, la muestra líquida se convierte en un spray fino y transcurre a través de un capilar hasta llegar a una aguja situada en el extremo del mismo. Es aquí donde al aplicar el campo eléctrico se produce una separación espacial de cargas en el menisco del líquido, situándose en la superficie aquellas de igual signo que el potencial aplicado. El exceso de cargas del mismo signo provoca la desestabilización del menisco, formando un cono denominado cono de Taylor y dando lugar a la emisión de una spray fino de gotas de la misma polaridad, como se observa en la Figura 7.

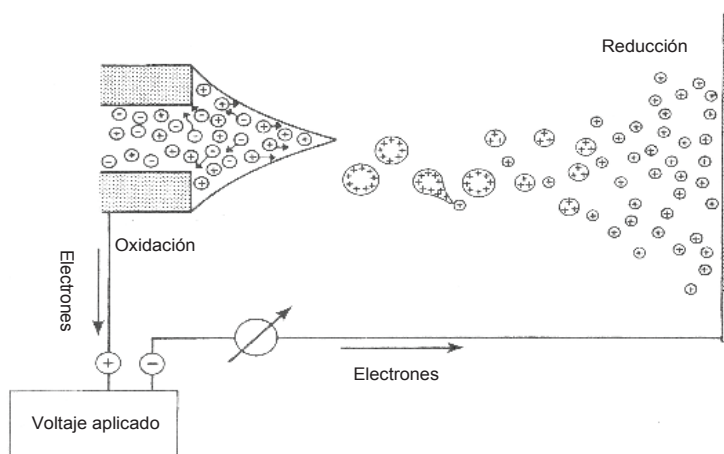


Figura 7. Esquema del proceso de formación del aerosol al aplicar un alto campo eléctrico [Cole, 1997]

Seguidamente, tiene lugar la eliminación del disolvente con ayuda de nitrógeno gas y temperaturas elevadas. Cuando esto ocurre, las pequeñas gotas sufren una contracción de volumen, lo que implica que las cargas estén excesivamente cerca y aumenten las repulsiones electrostáticas entre ellas. Esta situación desemboca en una explosión de Raleigh, en la que se liberan moléculas cargadas de la superficie de la gota con el fin de estabilizarla y con la que se obtienen gotas de menor tamaño [Cole, 1997]. El proceso se repite hasta obtener los iones en fase gas (Figura 8).

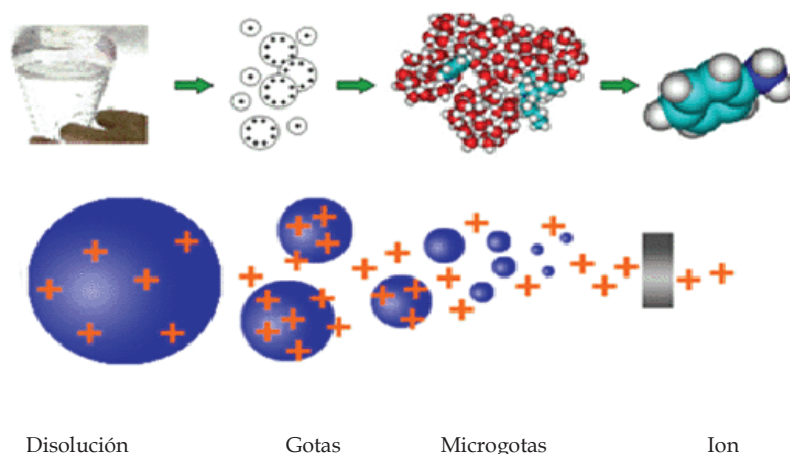


Figura 8. Esquema de la explosión de Raleigh que tiene lugar al eliminar el disolvente

En comparación con las otras técnicas de ionización, la sensibilidad obtenida con ESI es de 30-50 veces mayor que con APCI por lo que se pueden utilizar flujos menores [Petrovic *y cols.*, 2002b]. Sin embargo, presenta alguna desventaja como el efecto matriz, mayor que en las otras técnicas de ionización a presión atmosférica [Benijts *y cols.*, 2004a], debido en parte a que la ionización en ESI se lleva a cabo en fase líquida, mientras que en APCI y APPI ocurre en fase gas. Además es necesario tener en cuenta factores como el pH, la volatilidad y concentración de los modificadores utilizados, y la formación de clústeres con las moléculas de fase móvil, que pueden afectar a la ionización (supresión y aumento de la señal obtenida).

1.2.2. Analizadores de masas

El cometido de un analizador de masas es separar los iones en función de su relación masa/carga (m/z) tras la ionización. Según el principio físico por el que se rige la separación, se habla de diferentes analizadores [Benijts *y cols.*, 2004a]. En LC-MS y LC-MS/MS se utilizan, entre otros, el cuadrupolo (Q), el triple cuadrupolo (QqQ), el analizador de tiempo de vuelo (TOF), la trampa de iones cuadrupolares (IT), la trampa de iones lineales (LIT) o el *Orbitrap*.

Dentro de las características que se tienen en cuenta para la elección de un analizador destacan el rango de masas, la resolución, la sensibilidad, la adaptabilidad o el coste. En la Tabla 8 se muestran estas características para alguno de los analizadores antes mencionados.

Tabla 8. Parámetros de los analizadores de masas más utilizados en cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas [Holcapek y cols., 2012]

Analizador	Poder resolución (x10 ³)	Exactitud masa (ppm)	Rango m/z (x10 ³)	Velocidad adquisición (Hz)	Rango lineal dinámico	Coste
Q	3-5	Baja	2-3	2-10	10 ⁵ -10 ⁶	Bajo
IT	4-20	Baja	4-6	2-10	10 ⁴ -10 ⁵	Moderado
QqQ	7,5	5	2-3	5	10 ⁴ -10 ⁵	Moderado
TOF	10-60	1-5	10-20	10-50	10 ⁴ -10 ⁵	Moderado
<i>Orbitrap</i>	100-240	1-3	4	1-5	10 ³	Alto
FT-ICR	750-2500	0,3-1	4-10	0,5-2	10 ⁴	Alto

Como se puede observar, las características de cada analizador lo hacen adecuado para una finalidad. Así, para análisis de rutina de matrices sencillas en los que no se requiera una elevada sensibilidad, el cuadrupolo es una buena opción, debido a su sencillez y robustez; sin embargo, si se pretende conocer los metabolitos de un compuesto presentes en una muestra tras un estudio de degradación, los analizadores de masa exacta (como el TOF o el *Orbitrap*) son la mejor opción.

Aunque hoy en día existen en el mercado “híbridos” que combinan y mejoran las propiedades de cada analizador por separado (como el QTRAP, QTOF, LIT-Orbitrap, etc.), todavía no existe el analizador ideal. Uno de los más utilizados por su sensibilidad, selectividad y coste moderado es el triple cuadrupolo (QqQ), empleado a lo largo de esta memoria.

✓ Triple cuadrupolo (QqQ)

Un cuadrupolo consiste en cuatro rodillos circulares (o hiperbólicos) dispuestos en paralelo dos a dos, situándose los polos en torno a un eje central. Mediante la aplicación de campos eléctricos y magnéticos los iones entran en el cuadrupolo y empiezan a oscilar, describiendo una trayectoria que depende de su relación m/z. La combinación de un campo eléctrico y una radiofrecuencia determinada es la que permite la separación según la relación m/z; de este modo el cuadrupolo actúa como un filtro, pues sólo llegan al detector los iones seleccionados.

El triple cuadrupolo “QqQ”, como su nombre indica, está formado por “tres cuadrupolos” colocados en serie. Las “Q” hacen referencia a cuadrupolos donde tiene lugar la separación de iones mientras que con la “q” se designa a la celda de colisión, cuya estructura es en realidad un octapolo o hexapolo lo que facilita la transmisión de iones, donde tiene lugar la posible fragmentación.

La estructura del QqQ se muestra en la Figura 9, junto a los potenciales que se aplican para asegurar la llegada de los iones al analizador y el paso a su través hasta el detector.

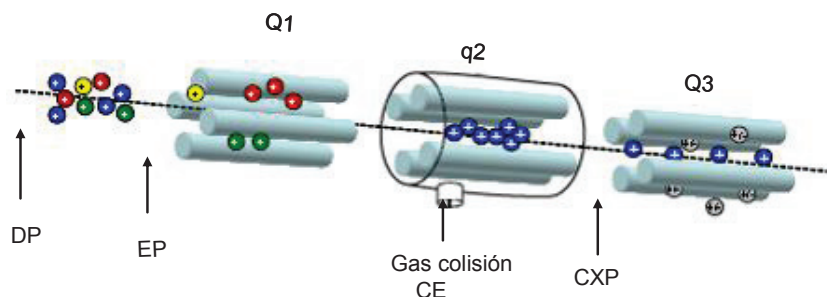


Figura 9. Esquema de un analizador de masas triple cuadrupolo QqQ, donde DP=potencial declustering; EP=potencial de entrada; Q1=primer cuadrupolo; CE=energía de colisión, q2=celda de colisión; CXP=potencial de salida de celda y Q3=tercer cuadrupolo

Los iones pasan a través de un pequeño orificio de entrada en el que se aplica un potencial llamado *declustering* (DP), que impide la formación de clusters, dando lugar a un haz de iones. Para evitar que los iones puedan desviarse de su trayectoria y no ser detectados se coloca un *skimmer*, que mantiene la trayectoria recta hasta la entrada del primer cuadrupolo (Q1), la cual se ve favorecida con la aplicación de un nuevo potencial EP (potencial de entrada). Tras el primer filtro de iones en el Q1, los iones seleccionados llegan al q2 (o celda de colisión), donde se fragmentan en nuevos iones con ayuda del gas de colisión y tras aplicar una energía de colisión adecuada (CE). La fragmentación por colisión del ion seleccionado con las moléculas de un gas inerte se conoce como disociación inducida por colisión (CID). El tiempo que los iones están en la celda lo marca el potencial de salida (CXP), que dirige a los iones hasta el tercer cuadrupolo (Q3) y de éste al detector.

Este analizador permite trabajar en MS y en MS/MS. Así, en función del objetivo buscado en el análisis (cuantificación de compuestos, fines de cribado, etc.) se utilizan distintos modos de adquisición (Figura 10), los cuales se comentan a continuación:

- Barrido de todos los iones (*full scan*). En este modo todas las moléculas ionizadas llegan al detector. La celda de colisión y el tercer cuadrupolo no actúan en el proceso de selección; el barrido de iones tiene lugar en el primer cuadrupolo.
- Adquisición de un ion seleccionado (SIM). En el primer cuadrupolo se selecciona un único ion, que es el que llegará al detector. De nuevo, la celda de colisión y el tercer cuadrupolo no intervienen en el proceso de selección.
- Barrido de iones producto (*Product Ion Scan*). El ion seleccionado en el primer cuadrupolo, conocido como ion precursor, se fragmenta en la celda de colisión aplicando un potencial determinado. En el tercer cuadrupolo se lleva a cabo un barrido de todos los iones, obteniéndose un espectro en *full scan* en el que se muestran todas las fragmentaciones del ion precursor (iones productos).
- Adquisición de una reacción seleccionada (SRM) o adquisición de reacción múltiple (MRM). Este es el modo de adquisición más utilizado debido a su alta sensibilidad y selectividad. El ion precursor seleccionado en el primer

cuadrupolo se fragmenta en la celda de colisión dando lugar a iones producto, de los cuales se selecciona uno en el tercer cuadrupolo.

- Barrido de iones precursor (*Precursor Ion Scan*). En este caso se lleva a cabo un barrido de todos los iones en el primer cuadrupolo (*full scan*), los cuales se fragmentan en la celda de colisión aplicando un potencial determinado, mientras que en el tercer cuadrupolo se selecciona una única relación m/z . Este modo se aplica en el estudio de metabolitos, pues parten de una estructura química común.
- Barrido de pérdidas neutras (*Neutral Loss Scan*). En ambos cuadrupolos se realiza un barrido de todos los iones en desfase, tras su fragmentación en la celda de colisión. Se selecciona un valor de masa de diferencia entre ambos cuadrupolos, de modo que se determinan los analitos que presenten la masa neutra determinada.

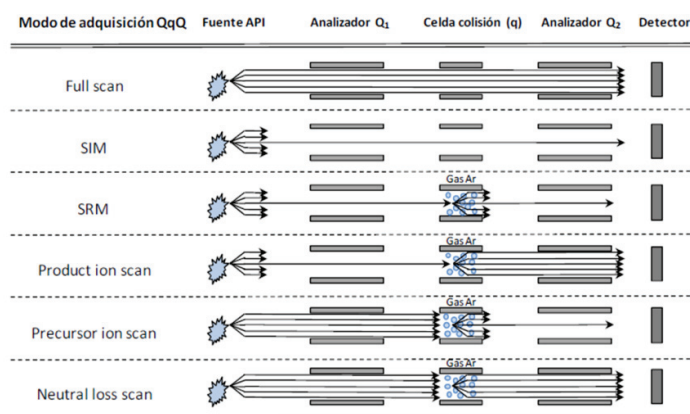


Figura 10. Modos de adquisición disponibles al utilizar un triple cuadrupolo (QqQ) [Grimalt-Brea, 2009]

2. TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN DE AGUAS

Las técnicas de extracción y/o preconcentración de matrices acuosas son necesarias para alcanzar los niveles traza a los que se encuentran estos contaminantes en el medio ambiente y los valores límites establecidos en la legislación. Si además se pretende utilizar esta metodología en programas de control y monitorización ambiental, características como la sencillez, la rapidez, la automatización o la poca cantidad de muestra requerida (facilitando el muestreo, transporte y conservación de la muestra) deben ser también consideradas.

2.1. Estado del arte

Entre las técnicas convencionales utilizadas para el análisis de APs y BPA en aguas destacan la extracción líquido-líquido (LLE) [Loyo-Rosales *y cols.*, 2004] y la extracción en fase sólida (SPE) [Céspedes *y cols.*, 2006; Guitart *y cols.*, 2010; Padilla-Sánchez *y cols.*, 2011; Petrovic *y cols.*, 2002a]. A pesar de que con estas técnicas se consiguen buenos resultados, actualmente están siendo sustituidas por otras más

sencillas, rápidas, automatizadas y miniaturizadas como las microextracción líquido-líquido (LLME) [Lin *y cols.*, 2011; Mudiam *y cols.*, 2014], la extracción con disolvente asistida por membranas (MASE) [Cavalheiro *y cols.*, 2014; Iparraguirre *y cols.*, 2014], la microextracción en fase sólida (SPME) [Huang *y cols.*, 2005; Liu *y cols.*, 2008] o la extracción con barras agitadoras (SBSE) [Nakamura *y cols.*, 2004; Pintado-Herrera *y cols.*, 2013b].

Estas nuevas metodologías son sostenibles, también llamadas “verdes”, lo que indica que se reduce la cantidad de reactivos tóxicos utilizados durante todo el procedimiento experimental, el consumo de energía o la generación de residuos; es decir, que cumplen los principios de la Química Verde. Debido a la importancia de la Química Verde a lo largo de esta memoria, cabe hacer una breve mención de su origen, su finalidad y su repercusión en la Química Analítica.

La Química Verde surge a principios de los noventa de la mano de Paul Anastas y John Warner [Anastas *y cols.*, 1998] y tiene como finalidad proteger la salud humana y el medio ambiente, cada vez más perjudicado por la actividad química e industrial. Desde entonces, y con el fin de alcanzar los objetivos propuestos, estas medidas se han aplicado en diferentes campos de la ciencia y la tecnología, la industria o la vida doméstica. Un claro ejemplo es el de la “Química Analítica Verde” (GAC), que introduce este concepto en los laboratorios químicos de análisis mediante el desarrollo de nuevas metodologías libres de disolventes, la minimización de residuos generados, la miniaturización de las técnicas de análisis, etc. La GAC nace a finales de los noventa; si bien no está claro quién ha ido su precursor, Jacek Namiènsnik [Namiènsnik, 1999] o Miguel de la Guardia [de la Guardia *y cols.*, 2012] son algunos de los nombres más destacados.

En la Tabla 9 se recogen los distintos métodos analíticos encontrados en la bibliografía entre 2002 y 2015 en Web of Science™ para la determinación de APs y BPA en aguas, junto a las características y parámetros de calidad analítica de cada uno de ellos.

Tabla 9. Metodología analítica para la determinación de APs y BPA en aguas (2002-2015, Web of ScienceTM). Características y parámetros analíticos. (NM=no mencionado)

Compuestos	Tipo de agua	Técnica de extracción	Características de la extracción	Técnica instrumental	R (%)	MDL/MQL (µg/L)	Ref
4-tOP, NP, BPA	Río, mar, abastecimiento, residual	SPE-on line	100 mL muestra. Precolumna SPE poliestirenodivinilbenceno. Elución con fase móvil.	HPLC-UV, MeOH:agua (1% acético)	41-97	MQL: 0,01-0,1	[Brossa y cols., 2002]
4-tOP, NP	Mar	SPE	NM mL muestra. Cartuchos C ₁₈ . Elución con 2 x 5 mL MeOH:DCM (9:1 v/v)	LC-MS/MS, ACN:agua (80:20):agua (5 mM acético)	81-91	MDL: 0,15	[Petrovic y cols., 2002a]
4-OP, NP	Residual	SPE	500 mL muestra. Cartuchos C ₁₈ . Elución con 2 x 4 mL MeOH	LC-MS/MS, ACN:agua	85-88	MDL: 0,1	[Petrovic y cols., 2002c]
NP	Abastecimiento	SPE	500 mL muestra. Cartuchos C ₁₈ . Elución con 2 x 4 mL MeOH	LC-MS/MS, MeOH:agua	85	MDL: 0,001	[Petrovic y cols., 2003]
4-tOP, 4- <i>n</i> -NP	Río, abastecimiento, residual	MMLE	0,96 mL muestra. Dispositivo de membrana microporosa de PTFE. Hexano como extractante	HPLC-FLD, ACN: agua (70:30 v/v)	74-110	MDL: 0,05-0,1	[Liu y cols., 2003]
4-OP, NP	Residual	SPE	4000 mL muestra. Cartuchos de C ₁₈ (500 mg, 6 mL). Elución con 3 mL propanol	LC-MS y LC-FLD, ACN:agua (58:42 v/v)	91-96	MQL: <0,15 (MS) ; <1,2 (FLD)	[Careri y cols., 2003]
4-OP, NP	Río	SPE	4000 mL muestra. Cartuchos ENV ⁺ (500 mg, 6 mL). Elución con 12 mL DCM + 12 mL MeOH + 12 mL acetona	LC-MS/MS, MeOH:agua-MeOH (50:50 v/v+ 10 mM acetato amónico)	95-110	MDL: 0,002-0,003	[Loyo-Rosales y cols., 2003]
4-tOP, NP, BPA	Mar, abastecimiento	SBSE	2 mL muestra. Barra agitadora recubierta de PDMS. Agitación durante 90 min a T° ambiente	GC-MS, derivatización: BSTFA	88-106	MQL: <0,026	[Basheer y cols., 2004]
4-tOP, 4- <i>n</i> -NP	Río, abastecimiento	HF-LPME	5 mL muestra. Extractante: tolueno. Tiempo de extracción: 30 min	TD-GC-MS, no derivatización	98-106	MQL: 0,01-0,1	[Kawaguchi y cols., 2004]
4-tOP, NP	Residual	SPE	1000 mL muestra. Columnas de vidrio con material Oasis HLB®. Elución con MeOH y DCM	LC-MS/MS, MeOH: agua (3 mM acetato amónico)	60-75	MDL: <0,004	[Jahnke y cols., 2004]

Tabla 9. Metodología analítica para la determinación de APs y BPA en aguas (2002-2015, Web of Science™). Características y parámetros analíticos. (NM=no mencionado)

Compuestos	Tipo de agua	Técnica de extracción	Características de la extracción	Técnica instrumental	R (%)	MDL/MQL (µg/L)	Ref
4-tOP, 4-OP, 4-n-NP, BPA	Río, abastecimiento, residual	SPE	500 mL muestra. Cartuchos Oasis HLB® (200 mg, 6 mL). Elución con 3 mL metilbutiléter	LC-MS/MS, ACN:agua	NM	NM	[Benijts y cols., 2004a]
4-tOP, 4-OP, 4-n-NP, BPA	Río, residual	SPE	500 mL muestra. Cartuchos Oasis HLB®. Elución con 2x3 mL propanol:metilbutiléter(10:90v/v)	LC-MS/MS, ACN:agua-ACN (80:20 v/v + 1 mM formiato amónico)	80-106	MQL: <0,04	[Benijts y cols., 2004b]
NP	Embotellada	LLE	500 mL muestra. Cartuchos ENV+ (500 mg, 6 mL). Elución con 12 mL DCM + 12 mL MeOH + 12 mL acetona	LC-MS/MS, MeOH:agua (10 mM acetato amónico)	87	NM	[Loyo-Rosales y cols., 2004]
4-tOP, 4-NP, BPA	Río, mar, residual	SPE	500 mL muestra. Cartuchos LiChrolut EN 200 mg. Elución con 5 mL ACN	LC-MS, ACN:agua (0,05% acético)	40-93	MDL: 0,001-0,3	[Brossa y cols., 2004]
4-tOP, 4-OP, 4-NP, BPA	Río	SBSE	10 mL muestra. Barra agitadora recubierta de PDMS. Agitación durante 60 min a Tª ambiente	TD-GC-MS, derivatización: K ₂ CO ₃ +acético	85-106	MDL: <0,032	[Nakamura y cols., 2004]
4-tOP, NP	Río, abastecimiento	SPE-on line	20 mL muestra. Cartuchos poliestirenodivinilbenceno. Elución con fase móvil.	LC-MS, ACN:agua	74-93	MDL: <0,065	[López-Roldán y cols., 2004]
4-n-NP, BPA	Residual	SPE	500 mL muestra. Cartuchos C ₁₈ (1 g, 6 mL). Elución con 5 mL de acetona + 2 x 5 mL MTBE:MeOH (9:1 v/v)	LC-MS, ACN:MeOH:agua + 10 mM acetato amónico	80-100	MDL: <0,003	[Martínez y cols., 2004]
4-tOP, NP, BPA	Río	SPE	500 mL muestra. Cartuchos C ₁₈ (500 mg, 6 mL). Elución con 2 x 5 mL ACN	LC-MS, ACN: agua	71-125	MDL: 0,09-0,15	[Céspedes y cols., 2004]
4-tOP, 4-n-NP, BPA	Río, abastecimiento	SPME	10 mL muestra. Fibra: CPANI. Desorción con fase móvil. Tiempo de extracción 150 min. Tª 30°C	HP/LC-FLD, ACN:agua (75:25 v/v)	84-123	MDL: <0,091	[Huang y cols., 2005]
4-tOP, NP, BPA	Mar	SPE-in situ	5000 mL muestra. Cartuchos Oasis HLB® Elución con 200 mL acetona:MeOH (80:20 v/v). Purificación 3 g de gel de sílice	LC-MS/MS, MeOH:agua (2,5 mM acetato amónico)	20-80	MDL: <0,00014	[Beck y cols., 2005]

Tabla 9. Metodología analítica para la determinación de APs y BPA en aguas (2002-2015, Web of ScienceTM). Características y parámetros analíticos. (NM=no mencionado)

Compuestos	Tipo de agua	Técnica de extracción	Características de la extracción	Técnica instrumental	R (%)	MDI/MQL (µg/L)	Ref
4-OP, NP	Río	Par iónico- SPE	20 mL muestra + reactivo par iónico (1mM). Cartuchos C ₁₈ . Elución 2 mL de acetona. Purificación 0,5 g sílica	GC-MS, derivatización: PFBBr	92-108	MDL: < 0,076	[Kojima y cols., 2005]
OP, NP	Río, residual	Micelas-SPE	500 mL muestra. Adsorbente: alúmina. Formación micelas: SDS pH=2. Elución: 2 mL MeOH	LC-MS, MeOH:agua	95-104	MDL: 0,07-0,11	[Cantero y cols., 2006]
4-OP, NP	Río, abastecimiento residual	TLFE	100 mL muestra. Membranas de PP expuestas a 1-octanol. Extracción durante 24 h. Desorción MeOH	HPLC-FLD, ACN:agua (1mM tampón fosfato)	NM	NM	[Liu y cols., 2006]
4-OP, 4-OP, 4- <i>n</i> -NP, BPA	Residual	SPE	500 mL muestra. Cartuchos C ₁₈ (500 mg, 3 mL). Elución 6 mL dietileter:MeOH (9:1)	GC-MS, derivatización: BSTFA	95-105	MQL: 0,02-0,15	[Ballesteros y cols., 2006]
4-OP, 4-OP, 4- <i>n</i> -NP, NP, BPA	Río, abastecimiento residual	SBSE	15 mL muestra. Barra agitadora recubierta de PDMS. Tiempo de extracción: 240 min. Desorción acetato de etilo	GC-MS, derivatización: MTSTFA	11-24	MDL: <0,021	[Quintana y cols., 2007]
4-OP, 4- <i>n</i> -NP, 4- <i>n</i> -NP, BPA	Residual y efluente industrial	SPE	1000 mL muestra. Cartuchos Oasis HLB® (200 mg, 6 mL). Elución con MeOH: acetona: acetato de etilo (2:2:1)	LC-MS/MS, ACN:agua (0,1 % acético)	NM	MDL: <0,010	[Loos y cols., 2007]
4-OP, BPA	Superficial	LPME	3 mL muestra. Par iónico 3 mM bromuro de tetrabutilamonio (TBAB). 2 µL cloroformo:octanol (1:1)	GC-MS, no derivatización	NM	MQL: 0,2-1,3	[Fiamigos y cols., 2007]
BPA	Residual	SPE	1000 mL muestra. Cartuchos C ₁₈ (500 mg). Elución 5 mL MeOH	LC-MS, MeOH:agua	NM	MDL: 0,38	[Gallart-Ayala y cols., 2007]
4- <i>n</i> -NP, BPA	Residual	SPE	100 mL muestra. Cartuchos C ₁₈ . Elución 4 x 2 mL DCM:hexano (4:1)	GC-MS, derivatización: BSTFA	31-93	MQL: 0,11-0,48	[Gatidou y cols., 2007]
4-OP, 4- <i>n</i> -NP, NP, BPA	Residual	SBSE	10 mL muestra. Barra agitadora recubierta de PDMS. Tiempo de extracción: 300 min, 500 rpm	TD-GC-MS, derivatización acetico	NM	NM	[Tan y cols., 2008]

Tabla 9. Metodología analítica para la determinación de APs y BPA en aguas (2002-2015, Web of ScienceTM). Características y parámetros analíticos. (NM=no mencionado)

Compuestos	Tipo de agua	Técnica de extracción	Características de la extracción	Técnica instrumental	R (%)	MDL/MQL (µg/L)	Ref
4-tOP, 4-OP, NP, BPA	Residual	SPE	500-1000 mL muestra. Cartuchos Oasis HLB® (200 mg, 6 mL). Elución 2x5 mL acetona	GC-MS, derivatización: BSTFA	72-115	NM	[Pothitou y cols., 2008]
BPA	Río, residual	SPE-muestreo pasivo	POCIS. Cartucho Oasis HLB® (100 mg). Elución 3 x 10 mL MeOH. Extracción 10 días, profundidad de 50-100 cm	GC-MS, no derivatización	80-87	MQL:<0,000487	[Zhang y cols., 2008]
4-tOP, 4-OP, NP, NPA	Río, mar, residual	SPE-muestreo pasivo	POCIS. Cartucho Oasis HLB® (100 mg). Elución 50 mL acetona. Extracción 28 días	GC-MS, derivatización: BSTFA	77-105	NM	[Arditsoglou y cols., 2008]
4-tOP, 4- <i>n</i> -NP, NP	Abastecimiento, lago	SPME	2 mL muestra. Fibra poliacrílico. Tiempo de extracción 30 min. Temperatura 65°C	GC-MS, derivatización: MTBSTFA	91-115	MDL: <0,00385	[Pan y cols., 2008]
NP, BPA,	Abastecimiento	SPME	40 mL de muestra. Fibra de CW/TPR. Extracción de 60 min a 40°C y pH=4. Desorción 14 min	HPPLC-FLD, ACN:agua	95-113	MQL: 0,34-0,90	[Liu y cols., 2008]
4-tOP, 4-OP, NP, 4-tOP	Río, abastecimiento	MSPE	10 mL muestra + 50 µL adsorbente (Chromosorb®+ disolución alcalina). Agitación 2400 min. Elución MeOH	GC-FiD	47-97	MDL: 0,7-1	[Komarek y cols., 2009]
NP	Residual	RDSE	250 mL de muestra. Disco Teflon con barra PDMS. Agitación 20 min. Desorción con metanol a 45°C y 20 min	GC-MS, no derivatización	84-122	MDL: 0,09	[Richter y cols., 2009]
BPA	Río, abastecimiento	DLLME	10 mL de agua. 2 mL acetona (dispersante) + 142 µL cloroformo (extractante). Centrifugación (5 min, 6000 rpm)	HPPLC-UV, ACN:agua (55:44)	93-98	MQL: 0,07	[Rezaee y cols., 2009]
4-tOP, NP	Río	DLLME	5 mL de agua. 0,5 mL MeOH-piridina (4:1 v/v) (dispersante) + 50 µL cloroformo (extractante). Centrifugación	GC-MS, derivatización MCF	88-106	MDL: 0,007-0,08	[Luo y cols., 2010]
OP, NP, BPA	Río, abastecimiento, residual	VALLME	20 mL de agua. 50 µL octanol. Agitación 2 min en vórtex y centrifugación (2 min, 3500 rpm)	HPPLC-FLD, ACN:agua (80:20)	66-110	MDL: 0,01-0,07	[Yiantzi y cols., 2010]

Tabla 9. Metodología analítica para la determinación de APs y BPA en aguas (2002-2015, Web of ScienceTM). Características y parámetros analíticos. (NM=no mencionado)

Compuestos	Tipo de agua	Técnica de extracción	Características de la extracción	Técnica instrumental	R (%)	MDI/MQL (µg/L)	Ref
BPA	Río, abastecimiento, residual	SPLE on line	1000 mL muestra. C ₁₈ como fase estacionaria. Elución con fase móvil	LC-MS/MS, ACN:MeOH: agua (30:20:50)	NM	MDL: <0,115	[Gallart-Ayala y cols., 2010a]
NP, OP	Río, abastecimiento	DLLME	5 mL muestra. 1,5 mL acetona (dispersante) + 50 µL tricloroetileno (extractante). Centrifugación (10 min, 5000 rpm)	HPLC-FLD, MeOH:ACN:agua (50:15:35)	75-77	MQL: 0,10-0,33	[Zgola-Grzeskowiak, 2010]
4-tOP, 4-n- NP, BPA	Río, mar, residual	SPE	2000 mL muestra. Cartuchos Oasis HLB® (500 mg, 6 mL). Elución 12 mL DCM:acetato de etilo:MeOH (2:2:1)	GC-MS, derivatización: MTSTFA	57-91	MDL: <0,001	[Guitart y cols., 2010]
4-NP, BPA	Abastecimiento y embotellada	SPE	1000 mL muestra. Cartuchos Supelclean ENVI-18 (500 mg, 3 mL). Elución con 8 mL de acetato de etilo	GC-MS, derivatización: PFBOCI	74-118	MQL: <0,007	[Li y cols., 2010]
4-NP	Río, residual	SPE	1000 mL muestra. Cartuchos de RP-C ₁₈ (200 mg) y EN (100 mg). Elución con 1,9 mL de ACN	GC-MS, derivatización: K ₂ CO ₃ +acético	96-113	NM	[Fischer y cols., 2010]
4-tOP, NP, BPA	Residual, nieve	SPE MEPS	500 mL de muestra. Adsorbente: 200 mg de RP-C ₁₈ . Elución 3 x 10 mL acetato de etilo: hexano (50:50 v/v) 5 mL muestra. Adsorbente: 2 mg C ₁₈ . Elución con 50+25 µL de una mezcla acetato de etilo:hexano (50:50 v/v)	GC-MS, no derivatización	111-129 94-97	MQL: <0,033 MQL: <0,121	[Prieto, 2010]
4-tOP, 4-OP, 4-n-NP, BPA	Mar	DLLME SDME	5 mL muestra. Extracción con 150 µL mezcla ACN (dispersante) + decanol (extractante). ratio (15, 7 v/v). Agitación 4 min a 2000 rpm y centrifugación (5 min, 3600 rpm) 5 mL muestra. Extractante: 2,5 µL de decanol. Agitación 60 min a 100 rpm	HPLC-UV, ACN:Agua	96-121 91-114	MDL: 0,7-1,6 MDL: 4-9	[López-Darías y cols., 2010]
4-tOP, 4-OP, NP	Embotellada, abastecimiento, piscina	IL-SPME	20 mL muestra. Fibra: líquido iónico polimérico (poly(VBHDIm ⁺ NTf ₂ ⁻)). Tiempo extracción 60 min a 1 ^{ra} amb	GC-FID	82-105	MDL: 0,055-1,5	[Lopez-Darías y cols., 2010]

Tabla 9. Metodología analítica para la determinación de APs y BPA en aguas (2002-2015, Web of ScienceTM). Características y parámetros analíticos. (NM=no mencionado)

Compuestos	Tipo de agua	Técnica de extracción	Características de la extracción	Técnica instrumental	R (%)	MDL/MQL (µg/L)	Ref
4-tOP, NP, BPA	Río, residual y nieve	IL-DLLME	10 mL muestra. Extractante: (C ₃ MIM)(PT ₆) a 80°C (temperatura controlada) hasta disolución. Centrifugación	HPLC-FLD, MeOH:Agua (75:25)	86-116	MDL: 0.23-0.48	[Zhou y cols., 2011]
4-tOP, 4-n-NP, BPA	Abastecimiento, lago o, lago	LLME	14 mL muestra. Extracción con microjeringa. Fase orgánica: hidróxido de tetrametilamonio. Aceptor: Clorotolueno. Agitación: 50 min	HPLC-FLD, ACN:Agua (0.05M fosfato amónico)	92-105	MDL: 0<0,017	[Lin y cols., 2011]
OP, NP	Mar	SPE-muestreo pasivo	POCIS. Cartucho Oasis HLB® (240 mg). Elución 20 mL MeOH. Extracción durante 6 semanas a una profundidad de 15 m	GC-MS, derivatización: PFBCI	NM	NM	[Harman y cols., 2011]
4-tOP, 4-n-NP, BPA	Embotellada	LLE	1000 mL muestra. Extracción 3 x 50 mL de DCM	GC-MS/MS, derivatización: BSTFA	77-92	MDL: 0.002	[Amiridou y cols., 2011]
OP, NP, BPA	Río, mar, residual	SPE	1000 mL muestra. Cartuchos Oasis HLB® (200 mg, 6 mL). Elución con 10 mL DCM/hexano (1:1 v/v) y 10 mL DCM/acetona (1:1 v/v)	GC-MS/MS, no derivatización	97-118	MDL: <0,028	[Sánchez-Avila y cols., 2011]
4-tOP, 4-OP, 4-n-NP, NP BPA	Río, residuales	MEPS	0,8 mL muestra. Adsorbente: 4 mg C ₁₈ . Elución con 50 µL de una mezcla acetato de etilo:DCM (70:30 v/v)	GC-MS/MS, derivatización: BSTFA	78-96	MDL: <0,013	[Prieto y cols., 2011]
4-tOP, 4-n-NP	Residual	SPE	250 mL muestra. Cartuchos Oasis HLB®. Elución con 3 mL de acetona + 2 mL DCM	GC-MS/MS, derivatización: acético	70-135	MQL: 0,03-0,05	[Padilla-Sánchez y cols., 2011]
4-tOP, 4-OP, NP, BPA	Mar, residual,	SBSE	100 mL muestra. Barra agitadora recubierta de PDMS. Tiempo de extracción: 15 h, 600 rpm	TD-GC-MS, derivatización BSTFA	99-147	MDL: <0,021	[Iparraguirre y cols., 2011]
4-n-OP, 4-n-NP	Río	SPE-micelas	200 mL muestra. Nanopartículas de grafeno + CTAB a pH=6,8, 20 min a 37°C. Elución con 1,5 mL de ACN	HPLC-UV, ACN:agua	76-85	MDL: 0,3-0,4	[Lin y cols., 2011]
4-tOP, 4-OP, 4-n-NP, BPA	Mar	Líquidos iónicos	2 mL muestra. Extracción con CTAB + LINTf ₂ . Elución con 200µL de ACN	HPLC-DAD, ACN:agua	94-100	MQL: 4,6-9,8	[Delgado y cols., 2012]

Tabla 9. Metodología analítica para la determinación de APs y BPA en aguas (2002-2015, Web of ScienceTM). Características y parámetros analíticos. (NM=no mencionado)

Tipo de agua	Técnica de extracción	Características de la extracción	Técnica instrumental	R (%)	MDL/MQL (µg/L)	Ref
Río, mar, residual	MASE	15 mL muestra. Membranas LDPE. Extractante: 800 µL de cloroformo. Agitación 60 min a 600 rpm	GC-MS, derivatización: BSTFA	42-124	MDL: <0,050	[Iparraguirre y cols., 2012]
Residual	SPE	500 mL muestra. Cartuchos Oasis HLB® (200 mg). Elución con 8 mL acetato de etilo + 8 mL hexano	GC-MS, derivatización: BSTFA	69-121	MDL: <0,055	[Bizkarguenaga y cols., 2012]
Abastecimiento	SPE	1000 mL muestra. Cartuchos Oasis HLB® (200 mg). Elución con 10 mL (DCM:hexano (1:1) + 10 mL acetona:DCM (1:1))	GC-MS, no derivatización	88-112	MQL: <0,029	[Bono-Blay y cols., 2012]
Embotellada, residual	SPE	200 mL muestra. Cartuchos C ₁₈ . Elución 5 mL MeOH	UPLC-MS/MS, MeOH:agua (0,01 % NH ₃ + 0,1 mM acetato amónico)	83-108	MQL: <0,290	[Fabregat-Cabello y cols., 2013]
Mar	SPE	4 L muestra. Cartuchos C ₁₈ . Elución 2 mL MeOH	UFLC-FLD, ACN:agua	85-104	MQL: <0,045	[Lisboa y cols., 2013]
Río, abastecimiento, residual	HF-LPME	50 mL muestra (donador). Fibra de PP con membrana de dihexileter (fase aceptora). Tiempo: 20 min	HPPLC-FLD, MeOH:agua (5% fórmico)	60-90	1,76-1,83	[Villar-Navarro y cols., 2013]
Superficial, mar, residual	SBSE	100 mL muestra. Barra agitadora recubierta de PDMS. Tiempo: 8 h, 900 rpm. Desorción: acetato de etilo	GC-MS, derivatización: MTSTFA	83-111	MDL: <0,011	[Pintado-Herrera y cols., 2013b]
Superficiales	SPE	250 mL muestra. Adsorbente: AffiniMIP® (200 mg). Elución 3 mL MeOH	LC-MS, MeOH:agua (0,15% NH ₄ OH)	80-120	MQL: <0,0064	[Matejcek y cols., 2013]
Río, abastecimiento	HF-LLME	50 mL muestra (donor). Fibra de PP que contiene membrana de n-dodecano. MeCN como fase aceptora	HPPLC-FLD, MeCN:agua (70:30 v/v)	97-100	MDL: 0,1-0,2	[Chao y cols., 2013]
Residual	MASE	130 mL muestra. Membranas LDPE. Extracción 800 µL de cloroformo, 60 min a 600 rpm. Purificación con Florisil® (1g)	LC-MS, MeOH:agua (0,05% NH ₄ OH)	74-137	MDL: <0,030	[Iparraguirre y cols., 2014]

Tabla 9. Metodología analítica para la determinación de APs y BPA en aguas (2002-2015, Web of ScienceTM). Características y parámetros analíticos. (NM=no mencionado)

Compuestos	Tipo de agua	Técnica de extracción	Características de la extracción	Técnica instrumental	R (%)	MDL/MQL ($\mu\text{g/L}$)	Ref
4-tOP, 4-nP, BPA	Residual	US-DLLME	5 mL muestra. 200 μL acetona (dispersante) + 100 μL DCM (extractante). Agitación 90 s. Centrifugación (3 min, 6000 rpm)	GC-MS/MS, derivatización: BSTFA	82-97	MQL: < 0,05	[Mudiam y cols., 2014]
4-tOP, 4-OP, 4-n-NP, NP	Río, residual	SPE	250 mL muestra. Cartuchos C ₁₈ . Elución 2 mL MeOH	LC-MS/MS, ACN-THF (10:90 v/v); agua (1 mM fórmico)	67-92	NM	[Ciofi y cols., 2014]
4-tOP, 4-n-NP	Superficial	DLLME	5 mL muestra. Extracción con 10 μL hexadecanetriol. Agitación manual 90 s. Centrifugación (2 min, 5000 rpm). Solidificación gota con baño de hielo	HPLC-DAD, ACN:agua	82-108	MDL: 0,8-1,5	[Sung y cols., 2014]
4-tOP, 4-OP, NP	Río, residual	MASE, SBSE; PES, SR	130 mL muestra. Extracción con dispositivo correspondiente y elución con 400 μL acetato de etilo	GC-MS, derivatización: BSTFA	83-124	MDL: <0,0296	[Cavalheiro y cols., 2014]
4-OP, 4-nP, BPA	Río	SDME	10 mL muestra. Extracción con 4 μL de mezcla octanol:octano (90:10) durante 40 min	HPLC-DAD, ACN:agua	92-111	MDL: 0,33	[Jiang y cols., 2015]
4-tOP, 4-OP, NP, BPA	Residual, mar	Micro-PES	150 mL muestra. Tubos PES. Extracción en US durante 8 min. Desorción con 300 μL de acetato de etilo.	GC-MS, derivatización: BSTFA	94-102	MDL: <0,076	[Ros y cols., 2015]
4-tOP, NP	Residual	IT-DLLME	5 mL muestra. Extracción con 25 μL de ácido heptanoico + 50 μL de NH ₄ OH (28%) + 700 μL H ₂ SO ₄ . Durante 30 s. Centrifugación	HPLC-UV-Vis, MeOH:agua (tampón fosfato)	92-107	MDL: 0,5-0,7	[Shih y cols., 2015]
4-tOP, 4-OP, 4-n-NP, NP, BPA	Mar	DLLME	30 mL muestra. Extracción con 100 μL de 1-octanol durante 5 min. A 1200 rpm. Centrifugación (3500 rpm, 3 min)	LC-MS/MS, MeOH: agua (0,05% amoniaco)	80-104	MQL: 0,005-0,03	Esta memoria
4-tOP, 4-OP, 4-n-NP, NP, BPA	Río, mar, abastec.	MASE	15 mL muestra. Membranas HDPP. Extracción con 500 μL de hexano durante 60 min a 750 rpm	LC-MS/MS, MeOH: agua (0,05% amoniaco)	81-108	0,0005-0,032	Esta memoria

Teniendo en cuenta la gran variedad de técnicas de extracción de matrices acuosas, en este Capítulo se hace referencia únicamente a las empleadas a lo largo de esta memoria: la microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) y la extracción miniaturizada asistida por membranas (MASE), comentando el fundamento de las técnicas así como sus ventajas y desventajas con respecto a otras técnicas de extracción.

2.2. Microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME)

Las técnicas de microextracción líquido-líquido (LLME) se rigen por el mismo principio que la extracción líquido-líquido (partición del analito entre dos disolventes inmiscibles); sin embargo, se llevan a cabo a pequeña escala utilizando un pequeño volumen (<1 mL) de disolvente orgánico. Entre las más utilizadas destacan la extracción con gota de disolvente (SDME), la microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) o la microextracción líquido-líquido en fibra hueca (HF-LLME).

La primera técnica de LLME nace en 1995 de la mano de Liu y Dasgputa [Liu *y cols.*, 1995], quienes introducen un sistema de extracción con una gota de disolvente (SDME) [Pena-Pereira *y cols.*, 2010]. Cuando el disolvente de extracción es una gota esférica, el área de contacto entre la fase orgánica y la fase acuosa es pequeña. Si en vez de una única gota se lograra formar una nube de gotas de menor tamaño, el área de contacto entre las fases aumentaría, mejorando el proceso de extracción.

Teniendo en cuenta esta premisa, y diez años más tarde (2006), Rezaee *y cols.* introducen la DLLME. Esta técnica se basa en la dispersión de las gotas del disolvente extractante en el seno de una muestra acuosa con ayuda de un tercer disolvente. Mientras que el extractante ha de ser inmiscible con el agua, el disolvente dispersante ha de ser polar y miscible con la muestra acuosa [Rezaee *y cols.*, 2006].

El procedimiento experimental es el siguiente: la mezcla de disolventes se inyecta en la muestra originando una gran turbulencia (pequeñas gotas) que permite que se alcance el equilibrio en unos pocos segundos debido al elevado contacto superficial entre extractante y analito, disminuyendo así el tiempo de extracción. Posteriormente se centrifuga, con el fin de que las pequeñas gotas de extractante se junten en una sola que pueda ser recogida con ayuda de una microjeringa (Figura 11).

Además de la elección del disolvente de extracción idóneo, la selección del dispersante es también un punto crítico para la obtención de resultados satisfactorios. Entre los disolventes de extracción más utilizados destacan los alcoholes de cadena larga (octanol, decanol, etc.) y los derivados clorados (cloroformo, DCM, etc.). En cuanto al dispersante, se emplean acetona, ACN y MeOH. Además, la proporción entre ambos (ratio v/v) es también importante, pues un volumen elevado de dispersante puede modificar la miscibilidad entre la fase acuosa y la fase orgánica, haciendo que se pierda parte del disolvente de extracción. El pH y el efecto salino son

otros factores que se suelen tener en cuenta a la hora de optimizar un método de DLLME, pues pueden afectar a la cinética del proceso.

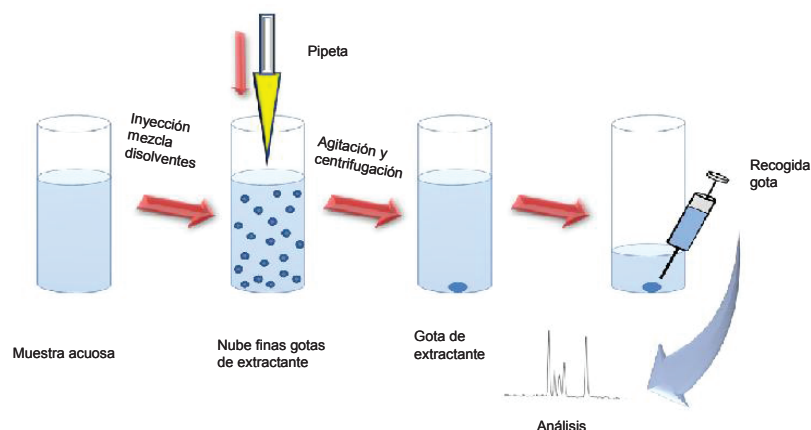


Figura 11. Etapas de la microextracción líquido-líquido dispersiva [Herrera-Herrera y cols., 2010]

La sencillez, rapidez y bajo coste de esta técnica ha propiciado su aplicación en el análisis de compuestos como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) [Rezaee y cols., 2006], disruptores endocrinos [López-Darias y cols., 2010], ftalatos [Fan y cols., 2014], etc. Algunas de las limitaciones de la DLLME son la dificultad de automatización y la necesidad de un tercer disolvente, que en ocasiones puede disminuir la solubilidad de los analitos en el extractante, al disminuir su coeficiente de partición [Yiantzi y cols., 2010].

Para minimizar estos problemas, algunos autores han sustituido el sistema ternario por uno binario; es decir, se elimina el disolvente dispersante y se utiliza únicamente un disolvente de extracción [Zhang, P. y cols., 2011]. En este caso, la homogeneización del sistema se consigue con agitación. Para ello se suele utilizar un baño de ultrasonidos (técnica llamada US-DLLME por algunos autores) [Mudiam y cols., 2014] que provoca la formación de sub-microgotas de extractante, lo que aumenta el contacto entre ambos disolventes y facilita la transferencia del analito a la fase orgánica, aumentando así el rendimiento de la extracción. Sin embargo, en ocasiones se producen emulsiones estables, que aumentan los tiempos de extracción, y pueden dar lugar a degradaciones de los compuestos [Yiantzi y cols., 2010].

Una técnica alternativa para la homogeneización de un sistema de fases inmiscibles que permite solucionar los problemas de ultrasonidos es la agitación vortex (nombrada en algunas ocasiones como VALLME) [Yiantzi y cols., 2010], empleada en esta memoria. Sin embargo, se hace referencia a ella con el término general DLLME, pues sigue siendo el más utilizado para designar este tipo de metodología.

2.3. Extracción con disolventes miniaturizada asistida por membranas (MASE)

Los dispositivos con membranas son cada vez más utilizados en la extracción de analitos orgánicos. Existen diferentes técnicas que utilizan estos sistemas en los que la membrana actúa como una barrera de separación entre ambas fases. Destacan la microextracción líquido-líquido con membranas (MLLME) o la extracción con disolvente asistida por membranas (MASE), que se diferencian principalmente en el tipo de membrana utilizada, porosa y no porosa, respectivamente.

La MASE fue desarrollada por primera vez por Hauser y Popp en 2001 para la determinación de pesticidas organoclorados en aguas [Hauser *y cols.*, 2001]. Se basa en la difusión de compuestos orgánicos disueltos en una fase acuosa (donador) a un pequeño volumen de disolvente orgánico (aceptor) a través de una membrana no porosa que actúa como interfase, evitando que las dos fases se mezclen y proporcionando mayor selectividad y sensibilidad en términos de permeabilidad y transporte [Rodil *y cols.*, 2007].

Dado que el sistema de extracción está formado por tres componentes, las propiedades de la fase acuosa (pH y efecto salino), la fase orgánica (disolvente de extracción y volumen) y la membrana (material y tamaño) deben ser consideradas a la hora de optimizar este tipo de metodología.

Las membranas más empleadas son de polipropileno de alta densidad (HDPP) y polietileno de baja densidad (LDPE). Generalmente, se utilizan dispositivos comerciales para llevar a cabo la extracción, si bien algunos autores han fabricado las membranas en el propio laboratorio (*made in house*), lo que permite aumentar el volumen de muestra y/o volumen de disolvente de extracción utilizado, incrementando así la sensibilidad del análisis [Iparraguirre *y cols.*, 2012].

Experimentalmente, los pasos a seguir son los siguientes (Figura 12): la muestra acuosa se introduce en un vial y se pone en contacto con el disolvente orgánico (máximo volumen 1 mL), contenido en la membrana. El vial se encapsula y se agita durante un tiempo determinado y a una temperatura fijada. Los materiales antes mencionados proporcionan una buena rigidez y resistencia, por lo que las membranas son capaces de resistir procesos de agitación sin romperse [Rodil *y cols.*, 2007]. Finalmente, se recoge el disolvente orgánico para su análisis.

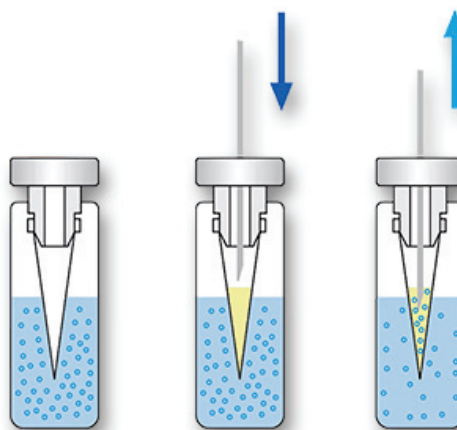


Figura 12. Dispositivo comercial utilizado para la MASE (Gerstel®)

La sencillez, automatización y bajo coste (ya que las membranas son reutilizables) de esta técnica ha propiciado que se utilice en el análisis de compuestos como los pesticidas organofosforados [Schellin *y cols.*, 2004], filtros UV [Rodil *y cols.*, 2009], hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) [Rodil *y cols.*, 2007], disruptores endocrinos [Iparraguirre *y cols.*, 2014], etc. Algunas de las limitaciones de esta variante son los tiempos de extracción relativamente altos (superiores a 60 min) y el hecho de que, para alcanzar una completa automatización, es necesario disponer de equipos bastante costosos.

3. TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN DE SEDIMENTOS

Los compuestos fenólicos suelen adsorberse a los suelos y sedimentos ($\log K_{oc} \sim 4-5$). El análisis de APs y BPA en matrices sólidas permite conocer la distribución de estos compuestos a través de los distintos compartimentos ambientales. Además, y en función de la localización de los compuestos (si están en la capa superficial o en las subcapas profundas), se puede predecir el período en el que se ha producido el episodio de contaminación: si es reciente o no, si es esporádica o permanente, etc. De hecho, esta matriz sólida es una de las consideradas alternativas, junto con la biota, para la evaluación de la contaminación del medio acuático.

3.1. Estado del arte

Existe un gran número de métodos analíticos para la determinación de estos compuestos en matrices sólidas (como los lodos generados en las estaciones depuradas de aguas residuales) que probablemente puedan ser empleados para el análisis de suelos y/o sedimentos con alguna modificación; sin embargo, la cantidad de métodos desarrollados y validados para el análisis de APs y BPA en estas matrices es mucho menor. Se siguen empleando técnicas convencionales como el Soxhlet [Croce *y cols.*, 2003; Mortazavi *y cols.*, 2012], las digestiones ácidas [Li *y cols.*, 2003] o básicas [Klosterhaus *y cols.*, 2013], o la extracción asistida por energía de ultrasonidos

(US) [Arditsoglou *y cols.*, 2012; Zhang *y cols.*, 2014] que consumen gran cantidad de reactivos tóxicos y/o grandes tiempos de extracción; aunque cada vez más se recurre a técnicas más sostenibles como la extracción asistida por energía microondas (MAE) [Delgado *y cols.*, 2012; Pérez *y cols.*, 2011] o la extracción con líquidos a presión (PLE) [Casatta *y cols.*, 2015; Petrovic *y cols.*, 2002a].

Debido a la complejidad de los suelos y sedimentos, que pueden contener numerosos interferentes entre los que destacan los ácidos húmicos y fúlvicos, suele ser necesaria una etapa de purificación posterior que facilite la determinación de los analitos y evite daños en el sistema cromatográfico. Generalmente se lleva a cabo una extracción en fase sólida (SPE) utilizando adsorbentes como gel de sílice [Chen *y cols.*, 2005; Gong *y cols.*, 2011], alúmina [Croce *y cols.*, 2003; Lacorte *y cols.*, 2006], Florisil® [Li *y cols.*, 2008; Pojana *y cols.*, 2007], C₁₈ [Céspedes *y cols.*, 2004; Petrovic *y cols.*, 2002a] o combinación de alguno de ellos [Duan *y cols.*, 2014; Luo *y cols.*, 2011]; también se utilizan técnicas de microextracción como la extracción con barras agitadoras (SBSE) [Llorca-Pórcel *y cols.*, 2009] o la microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) [Delgado *y cols.*, 2012]. En algunos casos, dependiendo de la técnica de extracción y determinación seleccionadas para el análisis, puede ser necesario realizar dos etapas de purificación consecutivas: por ejemplo, una extracción líquido-líquido (LLE) seguida de una extracción en fase sólida (SPE) [Peng *y cols.*, 2007].

En la Tabla 10 se recogen los distintos métodos analíticos encontrados en la bibliografía para la determinación de APs y BPA en sedimentos y suelos desde 2002 hasta la actualidad en Web of Science™, mencionando las técnicas de extracción, purificación y determinación empleadas y comentando aspectos clave como los parámetros analíticos de cada método o la cantidad de muestra necesaria para el análisis.

Tabla 10. Metodología analítica para la determinación de APs y BPA en suelos y sedimentos (2002-2015, Web of ScienceTM). Características y parámetros analíticos. (NM=nomencionado)

Compuestos	Tipo de matriz	Técnica y características de la extracción	Purificación	Técnica instrumental	R%	MDL/MQL (ng/g dw)	Ref
OP, NP	Sedimento mar y río	US. 1 g muestra. Extracción con 20 mL DCM:MeOH (7:3 v/v), 20 min	SPE, C ₁₈	LC-MS, ACN:agua	75-81	MDL: 20	[Petrovic y cols., 2002b]
OP, NP	Sedimento mar y río	PLE. 1 g muestra + 50 g de Na ₂ SO ₄ . Elución con acetona:hexano (50:50 v/v), presión 1500 psi, 3 ciclos x 10 min	SPE, C ₁₈	LC-MS/MS, MeOH:agua-metanol (50:50 v/v)	67-95	MDL: 0,9-1,4	[Petrovic y cols., 2002a]
4-OP, NP	Sedimento río	US. Extracción con DCM:MeOH (3:7 v/v)	SPE, aminopropilsilíce	LC-MS, ACN:agua (80:20):agua (5mM trietilamina)	75-81	MDL: 10	[Loyo-Rosales y cols., 2003]
NP	Sedimento río	PLE. 5g muestra. Extracción con acetona:MeOH (1:1), temperatura 75°C, presión 1500 psi, 2 ciclos x 5 min	SPE, alúmina neutra (15% H ₂ O desactivada)	LC-MS, ACN:agua	78-98	MDL: 1-2	[Croce y cols., 2003]
NP	Sedimento río	Soxhlet. 5 g muestra. Extracción con 120 mL MeOH durante 10 h		LC-MS, ACN:agua	79	MDL: 100	
4-tOP, 4-OP, NP, BPA	Sedimento	Digestión ácida. 3 g muestra. Extracción con 5 mL HCl 0.1 M durante 10 min	-	GC-MS, derivatización: BSTFA	81-100	MDL: 0,6-4,1	[Li y cols., 2003]
4-tOP, NP, BPA	Sedimento río	PLE. 6 g muestra. Extracción con MeOH a 100°C, 100 atm durante 5 min	SPE, C ₁₈	HPLC-FLD, MeOH:agua	85	MDL: 500	[Céspedes y cols., 2004]
4-tOP, 4- <i>n</i> -NP, BPA	Sedimento río	MAE. 5 g muestra. Extracción con 25 mL de MeOH, a 110°C durante 15 min	SPE, gel de sílice	GC-MS, derivatización: BTSFA	61-133	NM	[Liu y cols., 2004]
4-OP, 4- <i>n</i> -NP, BPA	Sedimento mar	MAE. 1000 g muestra. Extracción con 20 mL cloruro de metileno:MeOH (2:1 v/v) a 30% de potencia durante 25 min	SPE, PBP	GC-MS, no derivatización	60-95	MDL: 0,2-0,8	[Stuart y cols., 2005]
tOP, NP	Sedimento río	Soxhlet. 10 g muestra. Extracción DCM durante 48 h	SPE, gel de sílice	GC-MS, no derivatización	87-106	MQL: 1-10	[Chen y cols., 2005]

Tabla 10. Metodología analítica para la determinación de APs y BPA en suelos y sedimentos (2002-2015, Web of ScienceTM). Características y parámetros analíticos. (NM=nomenclado)

Compuestos	Tipo de matriz	Técnica y características de la extracción	Purificación	Técnica instrumental	R%	MDI/MQL (ng/g dw)	Ref
NP	Sedimento mar	MAE. 2 g muestra. Extracción con 15 mL MeOH a 159 kPa durante 15 min	SPE, Lichrolut®	GC-MS, no derivatización	NM	NM	[Cortázar y cols., 2005]
OP, NP	Sedimento río	US. 1 g muestra. Extracción con 30 mL de mezcla hexano:DCM (1:1 v/v)	SPE, alúmina neutra	GC-MS, no derivatización	>61	MDL: 1,8-8,0	[Lacorte y cols., 2006]
NP	Sedimento mar	US. 5 g muestra. Extracción con 30 mL DCM durante 30 min	SPE, gel de sílice	GC-MS, derivatización: BTSFA	88	NM	[Kurihara y cols., 2007]
NP, BPA	Sedimento mar	US. 20 g muestra. Extracción con mezcla acetona:MeOH (80:20 v/v) durante 2 h	SPE, Florisil®	LC-MS/MS, ACN:agua	78-86	MDL: 0,2-5,0	[Pojana y cols., 2007]
4-tOP, NP	Sedimento mar	Soxhlet. 2,5 g muestra. Extracción con DCM, 20 h	SPE, Florisil®	HPLC-FLD, ACN:agua	NM	MDL: 0,2-5,0	[Senthil Kumar y cols., 2008]
NP, BPA	Sedimento mar	US. 10 g muestra. Extracción con 5 mL mezcla acetona:DCM (1:1 v/v) + 3 mL agua	LLE, DCM + SPE, gel de sílice	GC-MS, no derivatización	NM	NM	[Peng y cols., 2007]
4-tOP, 4-OP, NP	Sedimento bosque	PLE. NM g muestra. Extracción con MeOH a 100°C y 98 bar durante 12 min (2 ciclos)	SPE, gel de sílice	GC-MS, derivatización: BTSFA	65-84	MQL: 0,1	[Fiedler y cols., 2007]
OP, NP	Suelo	PLE. 5 g muestra. Mezcla acetona:hexano (50:50 v/v) a 60°C y 550 psi durante 5 min (2 ciclos)	SPE, C ₁₈	LC-MS, MeOH:agua (5 mM acetato amónico)	91-97	MDL: 30	[Andreu y cols., 2007]
4-n-NP, NP	Sedimento mar	Soxhlet. NM g muestra. Extracción con DCM	SPE, Florisil®	GC-MS, derivatización: BTSFA	70-120	MDL: 10	[Li y cols., 2008]
NP	Sedimento río	Soxhlet. 5 g muestra. Extracción con 100 mL de DCM durante 24h a 55°C	SPE, Florisil®	HPLC-FLD, Hexano-isopropanol:agua-isopropanol	87-93	MDL: 5	[Yu y cols., 2008]

Tabla 10. Metodología analítica para la determinación de APs y BPA en suelos y sedimentos (2002-2015, Web of ScienceTM). Características y parámetros analíticos. (NM=no mencionado)

Compuestos	Tipo de matriz	Técnica y características de la extracción	Purificación	Técnica instrumental	R ^o %	MDL/MQL (ng/g dw)	Ref
NP	Sedimento suelo	PLE. 2 g muestra. Extracción acetona:MeOH (50:50 v/v) a 50°C durante 1 min (3 ciclos)	-	HPLC-UV-Vis, MeOH:agua	75-85	MDL: 15	[Reid y cols., 2009]
4-tOP, NP, BPA	Sedimento mar	US. 1 g muestra. Extracción con MeOH durante 30 min	SBSE	TD-GC-MS, derivatización: acetilación	78-89	MDL: 0,2-1,7	[Llorca-Pórcel y cols., 2009]
4-tOP, NP, BPA	Sedimento río	MAE. 4 g muestra. Extracción con 25 mL MeOH durante 20 min	GPC	GC-MS, derivatización: BSTFA	84-101	MQL: 0,31-0,40	[Wang y cols., 2009]
4-tOP, 4-OP, 4-n-NP	Suelo	PLE. 5 g muestra. Extracción MeOH a 70°C durante 5 min	SPE, ENV+	GC-MS, derivatización: BSTFA	98-102	MDL: 3-126	[Jiménez-Díaz y cols., 2010]
		PLE. 5 g muestra. Extracción MeOH a 70°C durante 5 min	SPE, ENV+	HPLC-FLC, THF:agua	93-104	MDL: 20-200	
4-tOP, 4-NP	Suelo	QueCHeRs. 10 g muestra. Extracción con 10 mL ACN + 5 MilliQ	-	GC-MS/MS, derivatización acético	90-108	MDL: 5	[Padilla-Sánchez y cols., 2010]
OP, NP, BPA	Sedimento río	PLE. 1 g muestra. Extracción con hexano:DCM (1:1) a 100°C	SPE, Florisil®	GC-MS	>60	MDL: 1-56	[Navarro-Ortega y cols., 2010]
OP, NP	Sedimento río	Soxhlet. 10 g muestra. Extracción con DCM durante 48 h	SPE, gel de sílice	GC-MS, derivatización: MSTFA	NM	NM	[Gong y cols., 2011]
		PLE. 10 g muestra + 10 g arena (dispersante). Extracción con tolueno:MeOH (1:6), durante 5 min a 100°C	SPE, gel de sílice	GC-MS, derivatización: MSTFA	82-95	NM	
NP, BPA	Sedimento río	US. NM g muestra. Extracción con DCM:acetona (1:1 v/v) durante 20 min	SPE, alumina/gel de sílice	GC-MS, derivatización: BSTFA	65-107	MDL: 0,5-7,4	[Luo y cols., 2011]

Tabla 10. Metodología analítica para la determinación de APs y BPA en suelos y sedimentos (2002-2015, Web of ScienceTM). Características y parámetros analíticos. (NM=no mencionado)

Compuestos	Tipo de matriz	Técnica y características de la extracción	Purificación	Técnica instrumental	R%	MDI/MQL (ng/g dw)	Ref
OP, NP	Suelo	MAE. NM g muestra. Extracción mezcla acetato de tilo: MeOH (90:10 v/v) durante 25 min a 110°C	SPE, Florisil®	GC-MS, derivatización: BSTFA	78-112	MDL: 0,4-1,1	[Pérez y cols., 2011]
		MSPD. NM g muestra. Dispersión 2 g C ₁₈ + 1 g sulfato sódico. Extracción con 10 mL ACN			87-109	MDL: 0,1-0,3	
4-tOP, NP	Sedimento mar	US. 1 g muestra. Extracción con 1 x 10 mL DCM/hexano + 2 x 10 mL hexano/acetona durante 10 min	SPE, Florisil®	GC-MS/MS, no derivatización	93-107	MDL: 38-48	[Sánchez-Avila y cols., 2011]
4-tOP, 4- <i>n</i> -NP, BPA	Sedimento mar	MAE. 0,1 g de muestra. Extracción con 3 mL CTAB durante 6 min a 90°C. potencia 140W	IL-DLLME (LiNf ₂)	HPLC-DAD, ACN:agua	94-108	MQL: 140-360	[Delgado y cols., 2012]
OP, 4-NP, BPA	Sedimento mar	Soxhlet. 10 g muestra. Extracción con 270 mL DCM durante 10 h	SPE, gel de sílice	GC-MS, no derivatización	85-100	NM	[Mortazavi y cols., 2012]
4-tOP, 4- <i>n</i> -NP, NP, BPA	Sedimento mar	US. NM g muestra. Extracción con acetato de etilo + mezcla acetona:MeOH (1:1)	SPE, Florisil®	GC-MS, derivatización: BSTFA	88-111	NM	[Arditsoglou y cols., 2012]
OP, NP, BPA	Sedimento río	US. 5 g sedimento. Extracción con 20 mL MeOH durante 15 min.	SPE, Carbón grafitizado	HPLC-FLD, ACN:agua-ACN (95:5)	80-90	MQL: 0,3-0,6	[Zhang y cols., 2012]
OP, NP, BPA	Sedimento mar	Digestión básica. 5 g muestra. Extracción con MeOH:KOH + hexano	SPE, gel de sílice	GC-MS, derivatización: acético	92-107	NM	[Klosterhaus y cols., 2013]
OP, 4- <i>n</i> -NP, BPA	Sedimento	US. 10 g muestra. Extracción con mezcla hexano:acetona (1:1)	SPE, MIPs	LC-MS-MS, MeOH:agua (0,15% NH ₄ OH)	92-104	NM	[Matejcek y cols., 2013]
4-tOP, NP	Sedimento mar	MAE. 5 g muestra. Extracción con 15 mL mezcla MeOH:acetona (8:2 v/v) durante 15 min	SPE, Gel de sílice + alúmina	GC-FiD	90-99	MQL: 1-1,9	[Duan y cols., 2014]

Tabla 10. Metodología analítica para la determinación de APs y BPA en suelos y sedimentos (2002- 2015, Web of ScienceTM). Características y parámetros analíticos. (NM=no mencionado)

Compuestos	Tipo de matriz	Técnica y características de la extracción	Purificación	Técnica instrumental	R%	MDL/MQL (ng/g dw)	Ref
4-tOP, 4- <i>n</i> -NP, NP, BPA	Sedimento mar	US. 5 g muestra. Extracción con 25 mL de mezcla MeOH:DCM (1:1 v/v) durante 20 min	SPE, C ₁₈	GC-MS, derivatización: BTSFA	>72	MQL: 0,06-0,5	[Zhang y cols., 2014]
4-tOP, NP	Sedimento mar	US. 2 g muestra. Extracción con 5 mL mezcla agua:MeOH (30:70 v/v) durante 15 min	SPE, C ₁₈	HPLC-FLD, ACN:agua	81-94	MQL: 0,08	[Konecko y cols., 2014]
4-tOP, 4-OP, 4- <i>n</i> -NP, NP	Sedimento río	PLE. 0,67 g muestra. Extracción con mezcla acetona:hexano (1:1 v/v) a 60°C, 3 ciclos	-	UPLC-LC-MS, MeOH:agua	65-112	MDL: 0,8-3,7	[Casatta y cols., 2015]
BPA	Sedimento río	PLE. 1,5 g muestra. Extracción con mezcla acetona: MeOH (1:1 v/v) a 100°C, 3 ciclos	-	UPLC-LC-MS, MeOH:agua			
4-tOP, 4-OP, NP, BPA	Suelo	FUSLE. 0,5 g muestra. Extracción con 10 mL acetona:hexano durante 5 min	dSPE, EnviCarb	LC-MS/MS, MeOH:agua (0,05% NH ₄ OH)	109-125	MDL: 0,9-31,1	[Mijangos y cols., 2015]
4-tOP, 4- <i>n</i> -OP, 4- <i>n</i> -NP, NP, BPA	Sedimento marino	SPLE. 0,5 g muestra. Extracción con MeOH a 150°C, 10 min (1 ciclo). 1,4 g de dispersante C ₁₈	In-cell, alúmina básica (3 g)	LC-MS/MS, MeOH:agua (0,05% amoníaco)	94-100	MQL: 0,17-4,0	Esta memoria
4-tOP, 4- <i>n</i> -OP, 4- <i>n</i> -NP, NP, BPA	Sedimento marino	PHWE. 0,5 g muestra. Extracción con mezcla agua ultrapura:MeOH (95:5) a 200°C durante 7 min (2 ciclos)	MASE	LC-MS/MS, MeOH:agua (0,05% amoníaco)	92-103	MQL:0,061-1,70	Esta memoria

En esta memoria se hace hincapié en dos técnicas de extracción, comentando su fundamento así como sus ventajas y limitaciones con respecto a otras técnicas de extracción: la extracción selectiva con líquidos a presión (SPLE) y la extracción con agua en condiciones subcríticas (PHWE).

3.2. Extracción selectiva con líquidos a presión (SPLE)

La extracción con líquidos a presión (PLE), también conocida como extracción con disolvente a presión (PSE) o extracción con fluidos presurizados (PFE), fue introducida en 1995 por Dionex® como extracción acelerada con disolvente (ASE®).

Esta técnica se basa en el uso combinado de temperaturas y presiones elevadas que favorecen la extracción de los analitos al facilitar su desorción de la matriz. Generalmente, se aplican temperaturas superiores al punto de ebullición del disolvente utilizado y por ello es necesario aplicar también presiones elevadas que mantengan este disolvente en estado líquido. En estas condiciones el disolvente se encuentra en un “estado subcrítico”, lo que favorece la extracción de los compuestos al producir un descenso de viscosidad del disolvente, que ayuda a romper las interacciones soluto-matriz y a incrementar los coeficientes de difusión [Carro y cols., 2013].

El sistema se basa en una celda de acero inoxidable, en la que se deposita la muestra que se somete a unos valores de presión y temperatura determinados y controlados mediante un horno y diferentes bombas, como se muestra en la Figura 13.

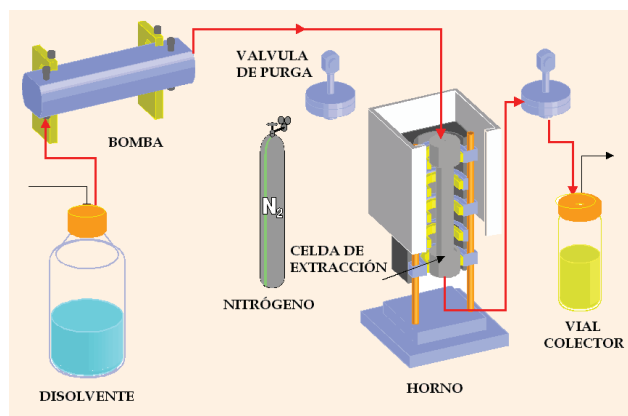


Figura 13. Esquema de un equipo de extracción ASE®

Al igual que en el caso de la extracción con dispersión de matriz en fase sólida (MSPD), es cada vez más común el uso de un adsorbente sólido denominado agente dispersante, que permite un mejor contacto entre el disolvente y la matriz, evita las interacciones entre las propias partículas de la muestra que provocan que ésta se compacte y reduce el volumen muerto de la celda de extracción.

La temperatura es uno de los factores que más influye en la PLE; sin embargo, parámetros como el disolvente de extracción (único o mezcla de varios), el modo de extracción (estático o dinámico), el uso o no de dispersante, el tipo de dispersante, el

ratio dispersante:muestra, el tiempo de extracción o el número de ciclos por extracción pueden ser también tenidos en cuenta durante la optimización del método.

El hecho de utilizar elevadas temperaturas y altas presiones favorece también la extracción de otros compuestos presentes en la matriz que deben ser eliminados antes de su análisis, siendo necesaria una etapa posterior de purificación. Lo tedioso de esta etapa puede minimizarse si la purificación se hace simultáneamente en la misma celda de extracción.

La extracción con líquidos a presión selectiva no es más que una extracción PLE a la que se le añade una etapa de purificación simultánea, introduciendo un adsorbente adecuado en el interior de la celda (*in-cell clean up*), como se muestra en la Figura 14.

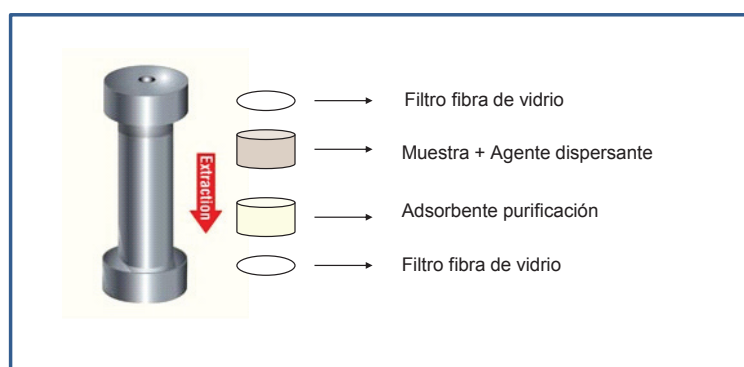


Figura 14. Esquema de una celda de extracción de SPLE

Precisamente la extracción y purificación simultánea es la gran ventaja de la SPLE, reduciendo el tiempo de análisis, el volumen de disolventes tóxicos utilizados y la generación de residuos, de acuerdo con los principios de la Química Analítica Verde. Otras ventajas son la rapidez, la automatización o la posibilidad de analizar compuestos térmicamente lábiles. Gracias a estas virtudes, la técnica se ha aplicado al análisis de diferentes compuestos en suelos y sedimentos como pesticidas organoclorados [Hussen *y cols.*, 2007], PCBs [Van Emon *y cols.*, 2013], dioxinas [Chuang *y cols.*, 2009] o estrógenos [Zhang, Z. *y cols.*, 2011]. Algunos inconvenientes son el elevado coste del equipo, la posible falta de reproducibilidad en los resultados y el hecho de que la purificación puede no ser suficiente en algunos casos.

3.3. Extracción con agua sobrecalentada (PHWE)

La extracción con agua sobrecalentada (agua en condiciones subcríticas), nace en el año 1994 de la mano de Hawthorne *y cols.* aplicada al análisis de compuestos polares y no polares en suelos [Hawthorne *y cols.*, 1994]. Si bien en los primeros años se consideró una modalidad de la PLE en la que se utiliza agua como disolvente a temperatura elevada y presión controlada, hoy en día se habla de una técnica independiente, debido al gran número de aplicaciones de esta técnica en distintos campos como el ambiental, el alimentario o el botánico [Teo *y cols.*, 2010].

El término de “agua sobrecalentada” o “agua subcrítica” hace referencia a la fase condensada del agua a temperaturas entre 100°C (punto de ebullición) y 374°C (punto crítico); para mantener el agua en estado líquido a estas temperaturas es necesario aplicar una presión controlada [Concha-Graña *y cols.*, 2010].

A temperatura y presión ambiente, el agua es un disolvente fuertemente polar, con una constante dieléctrica elevada debido a la presencia de puentes de hidrógeno. Teniendo en cuenta estas propiedades el agua no es un buen disolvente para el análisis de compuestos no polares. A medida que aumenta la temperatura del agua, se produce un descenso de su permeabilidad, viscosidad y tensión superficial; sin embargo, aumenta sus características de difusión. Si se aplica suficiente presión para mantener el agua en estado líquido a elevada temperatura, su constante dieléctrica desciende hasta 27 (250°C, 50 bar) similar a las de metanol ($\epsilon=33$) y etanol ($\epsilon=24$) a 25°C; en estas condiciones el agua puede disolver compuestos de polaridad baja y media [Teo *y cols.*, 2010].

El sistema utilizado para llevar a cabo este tipo de extracción es el mismo que para la PLE. La temperatura, el modo de extracción y el uso de aditivos son los parámetros que más afectan a la PHWE.

Tras la extracción, los extractos acuosos obtenidos requieren una etapa posterior de extracción y/o preconcentración que permita su análisis en un sistema cromatográfico. Entre las técnicas utilizadas destacan la SPE [García-López *y cols.*, 2009] o la extracción LLE [Richter *y cols.*, 2003], si bien las últimas aplicaciones introducen técnicas de microextracción, como la SBSE [Pintado-Herrera *y cols.*, 2013a] o la SPME [Fernández-González *y cols.*, 2008]. En esta memoria la PHWE se combina con la técnica de MASE, explicada en la págs. 52-53 de este Capítulo, obteniéndose una metodología totalmente sostenible, semi-automatizadas y que permite alcanzar bajos límites de cuantificación [Salgueiro-González *y cols.*, 2013]. Además, esta secuencia de técnicas no había sido utilizada hasta entonces para el análisis de estos compuestos, lo que demuestra su importancia.

La ventaja más destacable de PHWE es el uso de agua como disolvente de extracción, lo que reduce la cantidad de disolventes tóxicos empleados, así como la generación de residuos. Además, se trata de un disolvente barato y de fácil adquisición, lo que reduce el coste del análisis. La técnica recoge los puntos positivos de la PLE, como la automatización, la rapidez y la sencillez, por lo que se ha empleado en el análisis de otros compuestos en sedimentos como PAHs [Fernández-González *y cols.*, 2008], pesticidas organoclorados [Concha-Graña *y cols.*, 2010], retardantes de llama [García-López *y cols.*, 2009] o productos de higiene personal (PCPs) [Pintado-Herrera *y cols.*, 2013a]. Su principal limitación, como en la PLE, es el coste del sistema.

4. TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN DE BIOTA

Los polaridad media de los EDCs bajo estudio ($\log K_{ow} \sim 4$) muestra su tendencia a bioacumularse en los tejidos de los organismos, siendo posible su biomagnificación a lo largo de la cadena trófica. Este hecho, unido a su elevada actividad estrogénica, muestra la necesidad de estudios ecotoxicológicos (a distintos niveles tróficos) para conocer su comportamiento y sus efectos, a fin de preservar la biodiversidad y proteger la salud pública. Por otra parte, la legislación en política de aguas ha considerado recientemente la biota como matriz alternativa para la evaluación de la contaminación en el medio acuático y ya existen valores de EQS para algunos compuestos [Directiva-2013/39].

Todo lo anteriormente comentado pone de manifiesto la importancia del análisis de APs y BPA en organismos vivos; sin embargo, la complejidad de este tipo de matriz hace que la metodología analítica desarrollada siga siendo limitada y se base en técnicas convencionales de extracción tediosas, que requieren largos tiempos de análisis y gran cantidad de muestra, complicando así el muestreo y limitando los estudios ecotoxicológicos.

4.1. Estado del arte

Entre las técnicas de extracción más utilizadas para el análisis de los EDCs bajo estudio en biota destacan la destilación en corriente [Ferrara *y cols.*, 2005; Snyder *y cols.*, 2001], la extracción sólido-líquido con disolvente [Ferreira-Leach *y cols.*, 2001; Tsuda *y cols.*, 2000], el Soxhlet [Kumar *y cols.*, 2008; Wang *y cols.*, 2007] o la extracción asistida con energía de ultrasonidos (US) [Mottaleb *y cols.*, 2009; Navarro, 2010]. En los últimos años han surgido nuevas técnicas que sustituyen a las convencionales, como la extracción asistida con energía microondas (MAE) [Liu *y cols.*, 2011; Pedersen *y cols.*, 1999], la extracción con líquidos a presión (PLE) [Lacorte *y cols.*, 2006; Tavazzi *y cols.*, 2002] o la extracción con dispersión de matriz en fase sólida (MSPD) [Bouzas *y cols.*, 2011; Zhao *y cols.*, 1999]. Con ellas se consigue reducir el consumo de reactivos, la generación de residuos y el tiempo de análisis; además, se reduce la manipulación de la muestra por parte del analista (automatización de las técnicas) minimizando también la posible contaminación.

En la mayoría de los casos, y debido a la complejidad de la matriz, la etapa condicionante del análisis de microcontaminantes en biota suele ser la purificación, con la que se pretende eliminar interferentes (especialmente lípidos) que puedan influir en el análisis y dañar el sistema cromatográfico [Shao *y cols.*, 2007]. Existen diferentes técnicas de purificación de matrices sólidas, siendo las más comunes aquellas en las que se utilizan adsorbentes (como Florisil® [Ahn *y cols.*, 2007; Navarro, 2010; Tavazzi *y cols.*, 2002; Wang *y cols.*, 2007], alúmina [Blackburn *y cols.*, 1999; Zhao *y cols.*, 1999] o aminopropilsílice [Schmitz-Afonso *y cols.*, 2003; Shao *y cols.*, 2007]), o la cromatografía de gel permeación (GPC) [Meier *y cols.*, 2005; Navarro, 2010; Niu *y cols.*,

2011; Subedi *y cols.*, 2011]. En algunos casos, dependiendo de la especie analizada y de la técnica instrumental utilizada, puede ser necesario llevar a cabo dos etapas de purificación bien utilizando distintos adsorbentes [Schmitz-Afonso *y cols.*, 2003] o bien combinando técnicas diferentes (SPE y GPC) [Zhang, X. *y cols.*, 2011].

En la Tabla 11 se recogen los distintos métodos analíticos encontrados en la bibliografía para la determinación de APs y BPA en distintos organismos acuáticos desde 1999 hasta la actualidad en Web of ScienceTM. En cada caso se mencionan las especies estudiadas (generalmente peces y moluscos), las técnicas de extracción, purificación y determinación empleadas, recogiendo aspectos como la cantidad de muestra necesaria o los parámetros analíticos de cada método.

Tabla 11. Metodología analítica para la determinación de APs y BPA en biota (1999-2015, Web of ScienceTM). Características y parámetros analíticos. (NM=no mencionado)

Compuestos	Organismo	Técnica y características de la extracción	Purificación	Técnica instrumental	R%	MDI/MQL (ng/g dw)	Ref
4-tOP, NP	Trucha, mejillón	MSPD. 0,5-1 g muestra. C ₁₈ como dispersante (2 g). Elución con 10 mL de MeOH	Simultánea, Alúmina neutra	HPLC-FLD, MeOH:agua (80:20 v/v)	91-108	MDL: 10-30	[Zhao y cols., 1999]
4-OP, NP	Trucha, caballa, lenguado	Soxhlet. 2-5 g muestra. Extracción con 150 mL de DCM durante 4 horas	SPE, Alúmina	GC-MS, no derivatización	92-109	MDL: 100	[Blackburn y cols., 1999]
4-tOP, BPA	Trucha	MAE. 1 g muestra. Extracción con 20 mL DCM-MeOH (2:1 v/v) durante 25 min al 20% potencia	SPE, Aminopropil sílice	LC-MS, MeOH:agua	95-104	MQL: 10-50	[Pedersen y cols., 1999]
NP	Carpa dorada	Destilación en corriente. 20 g muestra. Extracción con 3 mL agua MilliQ + 10 mL isoctano. Tiempo: 2 x 1,5 h	SPE, gel de sílice	GC-MS, no derivatización	78	MQL: 4,82	[Snyder y cols., 2001]
4-tOP	Trucha	SLE. NM g muestra. Homogeneización 2 mL MeOH	SPE, Oasis HLB®	HPLC-UV, MeOH:agua (0,1 % acético)	>90	NM	[Ferreira-Leach y cols., 2001]
4-tOP, 4-NP, BPA	Trucha, corbícula	SLE. 5 g muestra. Homogeneización con 30 mL ACN	SPE, Florisil®	HPLC-FLD, MeOH:agua	70-84	MDL: 1-2	[Tsuda y cols., 2000]
4-OP, 4- <i>n</i> -NP, NP, BPA	Trucha	PLE. 1 g muestra. Dispersante: Na ₂ SO ₄ (2g). Mezcla de acetona:hexano (1:1 v/v). T ^a 100 °C, 5 min Soxhlet. 1 g muestra. Acetona:hexano (1:1 v/v). Tiempo de extracción: 12 horas	SPE, Florisil®	LC-MS/MS, ACN:agua	>98	MDL: 5-20 NM	[Tavazzi y cols., 2002]
4-tOP, NP	Perca, carpa, trucha	PLE. 7 g muestra + 28 g Na ₂ SO ₄ (dispersante). ACN. T ^a ambiente. 3 ciclos de 10 min	SPE, Aminopropil sílice + C ₁₈	LC-MS/MS, MeOH:agua	77-83	MQL: 6-22	[Schmitz-Afonso y cols., 2003]

Tabla 11. Metodología analítica para la determinación de APs y BPA en biota (1999-2015, Web of ScienceTM). Características y parámetros analíticos. (NM=no mencionado)

Compuestos	Organismo	Técnica y características de la extracción	Purificación	Técnica instrumental	R%	MDL/MQL (ng/g dw)	Ref
4-tOP, 4-nP	Besugo, mejillón	PLE. NM g muestra. Dispersante: Na ₂ SO ₄ (2g). Mezcla de ciclohexano:acetato de etilo (95:5 v/v). T° 60 °C, 2 ciclos, 10 min	GPC + SPE (amino)	GC-MS, derivatización: MSTFA	118- 138	0,2-2 (ww)	[Wenzel y cols., 2004]
OP, NP	6 especies peces y crustáceos	Destilación en corriente. 1-1,5 g muestra. Extracción acetona/hexano (3:5 v/v) + hexano/dietileter (9:1 v/v)	NM	GC-MS, no derivatización	79-94	NM	[Ferrara y cols., 2005]
4-tOP, 4-OP, 4-nP	Bacalao	SLE. 1 g muestra. Extracción 2 x 10 mL DCM. Durante 1 min	GPC	GC-MS, derivatización: PFBCI	80-91	MDL: 4,7-6,4	[Meier y cols., 2005]
4-OP, 4-nP, BPA	Almeja	MAE. 1 g muestra. Extracción con 20 mL cloruro de metileno:MeOH (2:1 v/v) durante 25 min al 30% potencia	SPE, PRP	GC-MS, derivatización: PTA-OH	60-95	MDL: 0,2-0,8	[Stuart y cols., 2005]
4-tOP, NP	Ostra	Destilación en corriente. 0,5 g muestra + 100 mL MilliQ + 4 mL hexano. Tiempo:1 h	-	GC-MS, no derivatización	88-92	MQL<20	[Liu y cols., 2011]
OP, NP	18 especies de peces	PLE. 0,4 g muestra. No dispersante. Hexano/DCM (1:1 v/v), T° 150°C, 2 ciclos 10 min	LLE, Hexano	GC-MS, no derivatización	61	MDL: 6-11	[Lacorte y cols., 2006]
4-tOP, 4-OP, NP	Mejillón, ostra	Soxhlet. 20 g muestra. Extracción con 200 mL de DCM. Durante 16 horas	SPE, 2xFlorisil®	GC-MS, derivatización: BSTFA	92-103	MDL: 1-3	[Wang y cols., 2007]
4-NP	Almeja	US. 0,1-0,2 g muestra. Extracción 5 mL ACN durante 5 min	SPE, gel de sílice	HPPLC-FLD, MeOH:agua	80	MDL: 10	[Lietti y cols., 2007]
4-tOP, 4-OP, NP, BPA	Caballa	US. 10 g muestra + 30 g Na ₂ SO ₄ . Extracción con 70 mL de MeOH durante 30 min	SPE, Oasis HLB® + Florisil®	GC-MS, derivatización: TBSTFA	70-120	MDL: 0,14-0,41	[Ahn y cols., 2007]

Tabla 11. Metodología analítica para la determinación de APs y BPA en biota (1999-2015, Web of ScienceTM). Características y parámetros analíticos. (NM=no mencionado)

Compuestos	Organismo	Técnica y características de la extracción	Purificación	Técnica instrumental	R ^o %	MDL/MQL (ng/g dw)	Ref
NP, BPA	Mejillón	US. 5 g muestra. Extracción con 2 x 20 mL de hexano:acetona (70:30 v/v) durante 2 h	SPE, Florisil®	LC-MS, ACN:agua	63-80	MDL: 0,3-5	[Pojana y cols., 2007]
4-tOP, 4-OP, 4-n-NP	Bacalao	Hidrólisis enzimática. Beta-Glucuronidasa y sulfatasa. Incubación durante 2h a 40°C y pH=5	SPE, C ₁₈	GC-MS, derivatización: BSTFA	101-105	MDL: 10	[Jonsson y cols., 2008]
4-tOP, OP, NP	Molusco, crustáceo y peces	SLE. 100 mg muestra. Extracción 3+3+1 mL ACN/0,1 N hidróxido sódico	LLE, Isoctano	GC-MS, derivatización: TFA	85-91	MDL: 0,5-12,4	[Ferrara y cols., 2008]
4-tOP, NP	Ostra	Soxhlet. NM g muestra. Extracción con DCM durante 20 h	SPE, Florisil®	HPLC-FLD, agua_ACN	95-105	MDL: < 5 (ww)	[Kumar y cols., 2008]
NP	Mejillón	PLE. 1 g muestra. Extracción con DCM (NM características)	SPE, Florisil®	GC-MS, derivatización: BSTFA	70-120	MQL: 10	[Li y cols., 2008]
4-tOP, NP	Perca	US. 1 g muestra. Agitación a 25°C durante 5 min con 10 mL acetona	SPE, gel de sílice	GC-MS/MS, derivatización: MSTFA	111-114	MDL: 2,4-2,9	[Mottaleb y cols., 2009]
4-tOP, 4-n-NP	Trucha	Soxhlet. 5 g muestra. Extracción con 150 mL DCM	SPE, Aminopropilsilice	HPLC-FLD, agua:acetona:MeOH (14/43/43 v/v)	64-65	NM	[Gadzala-Kopciuch y cols., 2009]
4-n-NP, BPA	Mejillón	SLE. 0,120 mg muestra. Extracción 8 mL mezcla MeOH (5 mL) + agua (3 mL) durante 30 min a 50°C	SPE, C ₁₈	GC-MS, derivatización: BSTFA	59-90	MDL: 59-115	[Gatidou y cols., 2010]

Tabla 11. Metodología analítica para la determinación de APs y BPA en biota (1999-2015, Web of ScienceTM). Características y parámetros analíticos. (NM=no mencionado)

Compuestos	Organismo	Técnica y características de la extracción	Purificación	Técnica instrumental	R ^o %	MDI/MQL (ng/g dw)	Ref
4-tOP, 4-OP, 4-n-NP, NP	Pez cebra	MAE, 0.03-1g muestra. Acetona (5mL), tiempo de extracción 15 min, 21 psi, 504W	SPE, Florisil®	GC-MS, derivatización: BSTFA	106-126	MDL: 0,04-2	[Navarro, 2010]
		US, 0.03-1g muestra. Acetona (5 mL), tiempo de extracción, 2 min, 5 ciclos					
4-tOP, NP	Mejillón	MAE. 0,8 g muestra. Extracción con 20 mL acetona:heptano 1:1 v/v). 110°C, 15 min	GPC	GC-MS, no derivatización	NM	MDL: 34-45	[David y cols., 2010]
4-tOP, 4-OP, NP	Salmonete	FUSLE+ Hidrólisis enzimática. NM g muestra + agua MilliQ + beta-glucuronidasa y beta-glucosidasa pH=6, 20 min	SPE, Oasis HLB®	GC-MS, derivatización: BSTFA	77-122	MQL: 7.2-34,9	[Vallejo y cols., 2010]
4-tOP, NP	Mejillón, almeja	MSPD. 0,1 g de muestra. Dispersante:NM. Extracción con ACN	SPME	GC-MS, no derivatización	75-80	MDL: 0,35-35	[Bouzas y cols., 2011]
4-tOP, NP	Mejillón	US. 1 g muestra. 1 x 10 mL DCM/hexano y 2 x 10 mL hexano/acetona. Tiempo de extracción, 10 min.	Florisil®	GC-MS, no derivatización	91-119	MQL: 26-83	[Sánchez-Avila y cols., 2011]
4-tOP, NP	3 especies de peces	PLE. 2,5 g muestra. Mezcla DCM:Acetato de etilo (1:1 v/v). T ^a = 80°C. Presión 1500 psi. Tiempo: 5 min	GPC	GC-MS/MS, derivatización: MSTFA	70-77	MDL: 1,2-3,1	[Subedi y cols., 2011]
OP, NP, BPA	Besugo, almeja	MAE. 1 g muestra. Extracción con MeOH durante 20 min a 110°C	GPC + SPE, gel de sílice	GC-MS, derivatización: MSTFA	67-121	MDL: 1,21-1,50	[Zhang, X. y cols., 2011]
4-tOP, NP, BPA	Carpa	PLE. 1 g muestra. Mezcla DCM:MeOH (7:3 v/v). NM más características	SPE, C ₁₈	GC-MS, derivatización: BSTFA	51-55	MDL: 0,3-0,4	[Liu y cols., 2011]

Tabla 11. Metodología analítica para la determinación de APs y BPA en biota (1999-2015, Web of ScienceTM). Características y parámetros analíticos. (NM=no mencionado)

Compuestos	Organismo	Técnica y características de la extracción	Purificación	Técnica instrumental	R%	MDL/MQL (ng/g dw)	Ref
NP	Mejillón, ostra, calamar	PLE. 2 g muestra. Cloruro de metileno, 100°C, 1500 psi, 2 x 5 min	SPE, gel de sílice	GC-MS, no derivatización	86	MDL: 0,05	[Diehl y cols., 2012]
BPA	11 especies de peces	QuEChERS. 0,5 g muestra. Extracción ACN + MgSO ₄ . Agitación 1 min	-	UPLC-MS/MS, agua:MeOH (pH=9)	55-109	MQL: 0,008-0,04	[Jakimska y cols., 2013]
4-NP, BPA	Carpa	Soxhlet. 10 g muestra. Extracción con DCM (200 mL) durante 10 horas	SPE, gel de sílice	GC-MS, no derivatización	85-100	MDL: 0,05-0,012	[Klosterhaus y cols., 2013]
4-OP, 4- <i>n</i> -NP, BPA	Mejillón	Destilación en corriente. 2 g muestra. Extracción con isooctano	SPE, Aminopropilsílice	LC-MS/MS, agua: ACN-MeOH (1:1)	97-109	MDL: 0,238-669	[Mortazavi y cols., 2013]
4-NP, BPA	Tilapia	SLE. 1 g muestra. Extracción con 5 mL MeOH + 5 mL acetona	SPE, Alúmina ácida	UPLC-MS/MS, agua:MeOH (pH=9,6)	NM	MQL: 0,12-11,5 (ww)	[Chen y cols., 2014]
4-OP, 4-OP, 4- <i>n</i> -NP, NP	Langostino, molusco, pez	US. 2 g muestra. Extracción con 20 mL ACN durante 15 min	SPE-PSA	LC-MS/MS, agua:MeOH (0,3% acetato amónico)	60-119	MDL: 0,015-0,48	[Gu y cols., 2014]
BPA		US. 2 g muestra. Extracción con 20 mL ACN durante 15 min	SPE-PSA	LC-MS/MS, agua:ACN (0,01% acético)	67-112	MDL: 0,37	
4-OP, 4-OP, 4- <i>n</i> -NP, NP	Ostra	PLE. 0,67 g muestra. Dispersante: alúmina neutra. Mezcla acetona:hexano (1:1 v/v). Temperatura 60°C. 3 ciclos	-	UPLC-MS/MS, NM fase móvil	65-112	MDL: 0,75	[Casatta y cols., 2015]
BPA		PLE. 1,5 g muestra. Dispersante: alúmina neutra. Mezcla acetona:MeOH (1:1 v/v). Temperatura 100°C	-				
4-OP, 4- <i>n</i> -OP, 4- <i>n</i> -NP, BPANP	Mejillón	SPLE. 0,5 g muestra. Extracción con MeOH a 150°C, 10 min (1 ciclo). 1,4 g de dispersante C ₁₈	In cell, alúmina neutra (3 g)	LC-MS/MS, agua:MeOH (0,05% amoniaco)	80-107	MQL: 1,7-4,7	Esta memoria

4.2. Extracción selectiva con líquidos a presión (SPLE)

En el apartado anterior de este Capítulo (págs. 60-61) ya se ha hecho referencia a la técnica utilizada para el análisis de APs y BPA en biota: la extracción selectiva con líquidos a presión, SPLE). Dado que ya se ha comentado el fundamento de la técnica y sus ventajas y limitaciones, en este apartado sólo se mencionarán las aplicaciones de esta técnica para la determinación de otros compuestos en biota, como PDBEs [Pena-Abaurrea *y cols.*, 2013], PCBs y dioxinas [Subedi *y cols.*, 2014], compuestos halogenados [Ghosh *y cols.*, 2011], antibióticos [Jiao *y cols.*, 2015], etc.

5. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD DEL MÉTODO ANALÍTICO

Asegurar la calidad de un método analítico (QA/QC) es un punto clave para garantizar su buen funcionamiento y su adecuación al objetivo planteado; para ello es necesario definir un protocolo que permita tanto su evaluación inicial como su verificación a lo largo del tiempo. Dado que en esta memoria se describe metodología analítica para la determinación de APs y BPA en distintas matrices ambientales, es conveniente detallar las pautas a seguir para el aseguramiento de la calidad analítica durante la optimización (llevada a cabo de modo uni- y multivariante), el estudio de validación y su posterior aplicación a muestras.

5.1. Problemas de contaminación de blancos en el análisis de alquilfenoles y bisfenol A

Los problemas de blancos son comunes en el análisis de los compuestos bajo estudio, sobre todo en el caso de los isómeros ramificados (4-tOP y NP) y del BPA. Son muchos los factores que afectan a este problema, por lo que es necesario trabajar minuciosamente y siguiendo unas consideraciones básicas. Por ejemplo, y ya que estos compuestos se utilizan en la fabricación de plásticos y/o detergentes, es obligatorio trabajar con material de vidrio en todas las etapas del procedimiento analítico; para el lavado de dicho material se debe evitar el uso de detergentes que puedan contener trazas de estos EDCs [Martínez *y cols.*, 2004].

Existen otras fuentes de contaminación de APs como los septum de los viales, disolventes o cartuchos de la extracción en fase sólida que pueden causar problemas de contaminación [Loos *y cols.*, 2008], al igual que algunos componentes del propio equipo de LC-MS, como los tubos y conexiones de plástico. En el caso del BPA, la principal fuente de contaminación se encuentra en los disolventes, concretamente en el agua ultrapura, debido a la migración del compuesto desde el sistema de purificación [Berkner *y cols.*, 2004; Choi *y cols.*, 2012]. En la medida de lo posible se evitará el uso del material previamente mencionado.

Los picos de gran intensidad presentes en los blancos dan lugar a límites de cuantificación altos que complican la determinación de 4-tOP, NP y BPA a niveles

traza. Además, afectan a la exactitud y precisión del método analítico, dando lugar a sobreestimaciones o subestimaciones en los resultados. Por ello, siempre que se observe la presencia de los compuestos en los blancos se debe intentar eliminar o reducir la señal en tanto como sea posible, por debajo de un valor marcado. Una vez que se consigue este objetivo, es necesario mantener los blancos bajo control. Durante la optimización, validación y aplicación de los métodos propuestos a lo largo de esta memoria se llevan a cabo blancos instrumentales y de procedimiento, con el fin de verificar que no existen problemas de contaminación.

5.2. Estudio de validación: parámetros de calidad analítica

El estudio de validación de la metodología analítica propuesta se lleva a cabo con muestras sobrecargadas, pues no se ha encontrado en el mercado ningún Material de Referencia Certificado (CRM) que presente APs y/o BPA en las matrices bajo estudio.

La cuantificación de los compuestos se realiza utilizando patrones internos subrogados (SIS) o rectas de adiciones estándar. La elección de uno u otro modo se decide al comprobar el efecto matriz asociado a cada metodología; teniendo en cuenta su importancia en la ionización por electrospray, este fenómeno debe ser estudiado. En cualquier caso, los parámetros analíticos que se tienen en cuenta para la validación del método son el rango lineal, la exactitud, la precisión, los límites de detección y cuantificación, y la estimación de la incertidumbre.

Para evaluar el rango lineal se construye una recta de calibrado sobre muestra (o una recta de adiciones estándar) a la que se añaden los patrones internos (IS), formada por siete-diez puntos que se analizan por duplicado o triplicado. La linealidad se verifica con el coeficiente de determinación (r^2), considerado aceptable cuando es superior a 0,995 [Loyo-Rosales *y cols.*, 2003].

La exactitud del método analítico se evalúa a distintas concentraciones (dos o tres) situadas a lo largo del rango lineal del método, a partir del cálculo de recuperaciones analíticas. Para ello, la muestra se sobrecarga con una concentración conocida de los compuestos bajo estudio. Se puede diferenciar entre recuperación absoluta (AR) y recuperación relativa (RR), obtenidas al comparar la señal del compuesto o la señal relativa del compuesto frente al patrón interno en la muestra sobrecargada y en un patrón de la misma concentración, respectivamente. En los casos en los que no se refleje explícitamente en el texto el tipo de recuperación calculada, se supondrá una recuperación relativa. Se consideran satisfactorios valores de AR superiores al 50% y valores de RR comprendidos entre 80-120%.

Dentro del término de precisión del método se engloban la repetibilidad y la precisión intermedia, expresadas como desviación estándar relativa (DER%) y evaluadas a distintas concentraciones, como en el caso de la exactitud. Mientras que la repetibilidad se estudia a partir de una serie de resultados obtenidos de forma

idéntica (mismo operador, muestra, instrumento, día y laboratorio), la precisión intermedia se refiere a los resultados obtenidos al variar una única condición y manteniendo el resto de condiciones; generalmente el mismo operador analiza la misma muestra utilizando el mismo equipo pero en días diferentes. Para la repetibilidad se analizan seis-ochos réplicas en las mismas condiciones; para la precisión intermedia el número de réplicas es ocho-diez (una misma muestra durante ocho-diez días). Cuanto menor son los valores obtenidos de la DER% más preciso es el método. Se considera que estos parámetros son satisfactorios cuando la DER% es menor del 20-30%, teniendo en cuenta los niveles traza de los compuestos estudiados.

Los límites de detección (MDL) y cuantificación (MQL) del método analítico se estiman mediante las siguientes expresiones, respectivamente:

$$y = y_b + 3 \cdot S_b$$

$$y = y_b + 10 \cdot S_b$$

en donde y_b es la señal media del blanco y S_b su desviación estándar. El valor de y obtenido se interpola en el calibrado correspondiente, expresando así el resultado en unidad de concentración de analito. Con el término “blanco” se hace referencia a una muestra analizada con el método propuesto que no contiene o presenta una baja concentración de los compuestos bajo estudio.

La estimación de la incertidumbre del método analítico, para cada compuesto y para cada concentración considerada en el estudio de validación, se lleva a cabo de acuerdo con lo establecido en la guía de EUROCHEM/CITAC [Ellison *y cols.*, 2000]. En primer lugar se describe el mensurando sobre el cual se estimará la incertidumbre. Posteriormente se identifican y cuantifican las principales fuentes de incertidumbre, como pueden ser las relacionadas con el muestreo, almacenamiento de la muestra, pureza de los reactivos, etc. La incertidumbre combinada (u_c) se calcula de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$u_c(y) = \sqrt{u_1^2 + u_2^2 + u_3^2}$$

donde u_1 es la incertidumbre asociada a la muestra sobrecargada, u_2 a la precisión y u_3 a la exactitud. Para estimar la incertidumbre asociada a la muestra sobrecargada (u_1) se tiene en cuenta la concentración a la cual se realiza la sobrecarga (C_{muestra}) y todos los parámetros que influyen en la preparación de los patrones:

$$u_1 = C_{\text{muestra}} * \sqrt{\left(\frac{S_{\text{patrón}}}{C_{\text{patrón}}}\right)^2 + \left(\frac{S_{\text{pipeta}}}{V_{\text{pipeta}}}\right)^2 + \left(\frac{S_{\text{matraz}}}{V_{\text{matraz}}}\right)^2 + \left(\frac{S_{\text{balanza}}}{m_{\text{patrón}}}\right)^2}$$

en la cual se consideran la desviación asociada a los patrones y su concentración ($S_{\text{patrón}}$, $C_{\text{patrón}}$), el error y volumen de las pipetas y (S_{pipeta} , V_{pipeta}) y matraces (S_{matraz} , V_{matraz}) y el error de la balanza y la masa del patrón que se pesa (S_{balanza} , $m_{\text{patrón}}$).

Por otra parte, la incertidumbre asociada a la precisión (u_2) se expresa como la desviación estándar relativa obtenida como la precisión intermedia ($N=10$).

$$u_2 = \frac{S_{\text{prec inter}}}{\sqrt{N}}$$

La incertidumbre asociada a la exactitud (u_3) se expresa como la desviación de la recuperación ($N=7$). En este caso se lleva a cabo un test t -Student para determinar si la media experimental de la recuperación (X) es estadísticamente diferente del valor teórico de concentración (μ), de acuerdo con las siguientes ecuaciones:

$$u_3 = \frac{S_{\text{recup}}}{\sqrt{N}}$$

$$t_{\text{exp}} = \frac{|X - \mu|}{u_3}$$

Si los valores son estadísticamente iguales el término asociado a la incertidumbre de la exactitud se anula, pues su contribución es mínima; si no lo son, es necesario tenerlo en cuenta para el cálculo de la incertidumbre combinada.

Finalmente se estima la incertidumbre expandida (U_{exp}) usando el factor de cobertura ($k=2$) a un nivel de confianza del 95%.

$$u_{\text{exp}} = k * u_c$$

Para que una metodología se considere adecuada la incertidumbre expandida relativa, estimada con un factor de cobertura $k=2$ a un nivel de confianza del 95%, tiene que ser inferior al 50%, de acuerdo con lo establecido en la Directiva 2009/90/CE [Directiva-2009/90].

5.3. Análisis de muestras

5.3.1. Criterio de identificación de analitos en muestras

Como se explica en el Capítulo III (pág. 105), el método instrumental LC-MS/MS desarrollado presenta cuatro puntos de identificación para cada compuesto (ion precursor y dos iones producto) de acuerdo con la Decisión de la Comisión 2002/657/EC [Decisión-2002/657]. La transición de mayor intensidad se utiliza para la cuantificación y la de menor intensidad para la identificación.

La identificación de los compuestos en las muestras analizadas se lleva a cabo siguiendo esta misma normativa [Decisión-2002/657], que considera el tiempo de retención y el cociente entre las dos transiciones (MRM ratio) como criterios de confirmación. Para confirmar la presencia de un compuesto en una muestra, el tiempo de retención en la muestra no puede diferir en un porcentaje mayor a $\pm 2\%$ del valor observado en un patrón inyectado en LC-MS/MS; en el caso del MRM ratio, esta variación tiene que ser inferior al $\pm 20\text{-}50\%$ en función de su valor numérico.

5.3.2. Verificación de la calidad método analítico

Por cada serie de muestras analizadas se lleva a cabo un calibrado (que abarque el rango lineal correspondiente), tres blancos de procedimiento, y dos o tres muestras sobrecargadas (ensayos de recuperación) a las concentraciones del estudio de validación, con el fin de garantizar que el método sigue bajo control analítico.

Bibliografía

- Ahn, Y.G., Shin, J.H., Kim, H.Y., Khim, J., Lee, M.K., Hong, J. *Application of solid-phase extraction coupled with freezing-lipid filtration clean-up for the determination of endocrine-disrupting phenols in fish*, *Anal Chim Acta* (2007) 603, 67-75.
- Amiridou, D., Voutsas, D. *Alkylphenols and phthalates in bottled waters*, *J Hazard Mater* (2011) 185, 281.
- Anastas, P.T., Warner, J.C., *Green Chemistry: Theory and Practice*, 1998.
- Andreu, V., Ferrer, E., Rubio, J.L., Font, G., Picó, Y. *Quantitative determination of octylphenol, nonylphenol, alkylphenol ethoxylates and alcohol ethoxylates by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-mass spectrometry in soils treated with sewage sludges*, *Sci Total Environ* (2007) 378, 124-129.
- Arditsoglou, A., Voutsas, D. *Occurrence and partitioning of endocrine-disrupting compounds in the marine environment of Thermaikos Gulf, Northern Aegean Sea, Greece*, *Mar Pollut Bull* (2012) 64, 2443-2452.
- Arditsoglou, A., Voutsas, D. *Passive sampling of selected endocrine disrupting compounds using polar organic chemical integrative samplers*, *Environ Pollut* (2008) 156, 316-324.
- Ballesteros, O., Zafra, A., Navalón, A., Vilchez, J.L. *Sensitive gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of phthalate esters, alkylphenols, bisphenol A and their chlorinated derivatives in wastewater samples*, *J Chromatogr A* (2006) 1121, 154-162.
- Basheer, C., Lee, H.K. *Analysis of endocrine disrupting alkylphenols, chlorophenols and bisphenol A using hollow fiber-protected liquid-phase microextraction coupled with injection port-derivatization gas chromatography-mass spectrometry*, *J Chromatogr A* (2004) 1057, 163-169.
- Beck, I.C., Bruhn, R., Gandrass, J., Ruck, W. *Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of estrogenic compounds in coastal surface water of the Baltic Sea*, *J Chromatogr A* (2005) 1090, 98-106.
- Benijts, T., Dams, R., Lambert, W., De Leenheer, A. *Countering matrix effects in environmental liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry water analysis for endocrine disrupting chemicals*, *J Chromatogr A* (2004a) 1029, 153-159.
- Benijts, T., Lambert, W., De Leenheer, A. *Analysis of multiple endocrine disruptors in environmental waters via wide-spectrum solid-phase extraction and dual-polarity ionization LC-ion trap-MS/MS*, *Anal Chem* (2004b) 76, 704-711.
- Berkner, S., Streck, G., Herrmann, R. *Development and validation of a method for determination of trace levels of alkylphenols and bisphenol A in atmospheric samples*, *Chemosphere* (2004) 54, 575-584.
- Bizkarguenaga, E., Ros, O., Iparraguirre, A., Navarro, P., Vallejo, A., Usobiaga, A., Zuloaga, O. *Solid-phase extraction combined with large volume injection-programmable temperature*

vaporization-gas chromatography-mass spectrometry for the multiresidue determination of priority and emerging organic pollutants in wastewater, *J Chromatogr A* (2012) 1247, 104-117.

Blackburn, M.A., Kirby, S.J., Waldock, M.J. Concentrations of alkylphenol polyethoxylates entering UK estuaries, *Mar Pollut Bull* (1999) 38, 109-118.

Bono-Blay, F., Guart, A., de la Fuente, B., Pedemonte, M., Pastor, M.C., Borrell, A., Lacorte, S. Survey of phthalates, alkylphenols, bisphenol A and herbicides in Spanish source waters intended for bottling, *Environ Sci Pollut Res* (2012) 19, 3339-3349.

Bouzas, A., Aguado, D., Martí, N., Pastor, J.M., Herráez, R., Campins, P., Seco, A. Alkylphenols and polycyclic aromatic hydrocarbons in eastern Mediterranean Spanish coastal marine bivalves, *Environ Monit Assess* (2011) 176, 169-181.

Boyd, R.K., Basic, C., Bethem, R.A., *Trace Quantitative Analysis by Mass Spectrometry*, 2008.

Brossa, L., Pocurull, E., Borrull, F., Marce, R.M. A rapid method for determining phenolic endocrine disruptors in water samples, *Chromatographia* (2002) 56, 573-576.

Brossa, L., Pocurull, E., Borrull, F., Marce, R.M. Solid-phase extraction/high-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry to determine endocrine disruptors in water samples, *Chromatographia* (2004) 59, 419-423.

Cantero, M., Rubio, S., Pérez-Bendito, D. Determination of alkylphenols and alkylphenol carboxylates in wastewater and river samples by hemimicelle-based extraction and liquid chromatography-ion trap mass spectrometry, *J Chromatogr A* (2006) 1120, 260-267.

Careri, M., Elviri, L., Mangia, A., Zagnoni, I. Liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry and liquid chromatography with fluorescence detection for determination of octylphenol and nonylphenol in municipal wastewater at trace levels, *Chromatographia* (2003) 57, 321-327.

Carro, A.M., González, P., Lorenzo, R.A. Applications of derivatization reactions to trace organic compounds during sample preparation based on pressurized liquid extraction, *J Chromatogr A* (2013) 1296, 214-225.

Casatta, N., Mascolo, G., Roscioli, C., Vigano, L. Tracing endocrine disrupting chemicals in a coastal lagoon (Sacca di Goro, Italy): Sediment contamination and bioaccumulation in Manila clams, *Sci Total Environ* (2015) 511, 214-22.

Cavalheiro, J., Monperrus, M., Amouroux, D., Preud'Homme, H., Prieto, A., Zuloaga, O. In-port derivatization coupled to different extraction techniques for the determination of alkylphenols in environmental water samples, *J Chromatogr A* (2014) 1340, 1-7.

Céspedes, R., Lacorte, S., Ginebreda, A., Barceló, D. Chemical monitoring and occurrence of alkylphenols, alkylphenol ethoxylates, alcohol ethoxylates, phthalates and benzothiazoles in sewage treatment plants and receiving waters along the Ter River basin (Catalonia, N. E. Spain), *Anal Bioanal Chem* (2006) 385, 992-1000.

Céspedes, R., Petrovic, M., Raldúa, D., Saura, U., Piña, B., Lacorte, S., Viana, P., Barceló, D. Integrated procedure for determination of endocrine-disrupting activity in surface waters and sediments by use of the biological technique recombinant yeast assay and chemical analysis LC-ESI-MS, *Anal Bioanal Chem* (2004) 378, 697-708.

Ciofi, L., Ancillotti, C., Chiuminatto, U., Fibbi, D., Checchini, L., Orlandini, S., Del Bubba, M. Liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method for the simultaneous determination of alkylphenols polyethoxylates, alkylphenoxy carboxylates and alkylphenols in wastewater and surface-water, *J Chromatogr A* (2014) 1362, 75-88.

- Cole, R.B., *Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation and Applications*, 1997.
- Concha-Graña, E., Fernández-González, V., Grueiro-Noche, G., Muniategui-Lorenzo, S., López-Mahía, P., Fernández-Fernández, E., Prada-Rodríguez, D. *Development of an environmental friendly method for the analysis of organochlorine pesticides in sediments*, Chemosphere (2010) 79, 698-705.
- Cortázar, E., Bartolomé, L., Delgado, A., Etxebarria, N., Fernández, L.A., Usobiaga, A., Zuloaga, O. *Optimisation of microwave-assisted extraction for the determination of nonylphenols and phthalate esters in sediment samples and comparison with pressurised solvent extraction*, Anal Chim Acta (2005) 534, 247-254.
- Croce, V., Patrolecco, L., Polesello, S., Valsecchi, S. *Extraction of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates from river sediments: Comparison of different extraction techniques*, Chromatographia (2003) 58, 145-149.
- Chao, Y.-Y., Jian, Z.-X., Tu, Y.-M., Wang, H.-W., Huang, Y.-L. *An on-line push/pull perfusion-based hollow-fiber liquid-phase microextraction system for high-performance liquid chromatographic determination of alkylphenols in water samples*, Analyst (2013) 138, 3271-3279.
- Chen, B., Mai, B.X., Duan, J.C., Luo, X.J., Yang, Q.S., Sheng, G.Y., Fu, J.M. *Concentrations of alkylphenols in sediments from the Pearl River estuary and South China Sea, South China*, Mar Poll Bull (2005) 50, 993-997.
- Chen, W.L., Gwo, J.C., Wang, G.S., Chen, C.Y. *Distribution of feminizing compounds in the aquatic environment and bioaccumulation in wild tilapia tissues*, Environ Sci Pollut Res (2014) 21, 11349-11360.
- Choi, Y.S., Cho, S., Lee, C., Luu, H.M.-D., Guo, J. *Contamination of ultrapure water with bisphenol A leached from polysulfone ultrafilter*, Talanta (2012) 94, 353.
- Chuang, J.C., Van Emon, J.M., Schrock, M.E. *High-throughput screening of dioxins in sediment and soil using selective pressurized liquid extraction with immunochemical detection*, Chemosphere (2009) 77, 1217-1223.
- David, A., Gómez, E., Ait-Aissa, S., Bachelot, M., Rosain, D., Casellas, C., Fenet, H. *Monitoring organic contaminants in small French coastal lagoons: comparison of levels in mussel, passive sampler and sediment*, J Environ Monit (2010) 12, 1471-1481.
- de la Guardia, M., Garrigues, S., *Handbook of Green Analytical Chemistry*, 2012.
- Decisión de la Comisión 2002/657/CE, de 12 de agosto de 2002, por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados. D.O.d.I.C. Europeas,
- Delgado, B., Pino, V., Ayala, J.H., Afonso, A.M., González, V. *A novel preconcentration strategy for extraction methods based on common cationic surfactants: An alternative to classical coacervative extraction*, J Chromatogr A (2012) 1257, 9-18.
- Diehl, J., Johnson, S.E., Xia, K., West, A., Tomanek, L. *The distribution of 4-nonylphenol in marine organisms of North American Pacific Coast estuaries*, Chemosphere (2012) 87, 490-497.
- Directiva 2009/90/CE de la Comisión del 31 de julio de 2009 por la que se establecen, de conformidad con la Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, las especificaciones técnicas del análisis químico y del seguimiento del estado de las aguas. DOUE, L 201/36.
- Directiva 2013/39/UE del Parlamento Europeo y del Consejo de 12 de agosto de 2013 por la que se modifican las Directivas 2000/60/CE y 2008/105/CE en cuanto a las sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas. BOUE, L 226/1.

- Duan, X.-Y., Li, Y.-X., Li, X.-G., Zhang, D.-H., Gao, Y. *Alkylphenols in surface sediments of the Yellow Sea and East China Sea inner shelf: Occurrence, distribution and fate*, *Chemosphere* (2014) 107, 265-73.
- Ellison, S.L.R., Rosslein, M., Williams, A., *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurements*. EURACHEM/CITAC, 2000.
- Fabregat-Cabello, N., Castillo, A., Sancho, J.V., González, F.V., Francesc Roig-Navarro, A. *Fast methodology for the reliable determination of nonylphenol in water samples by minimal labeling isotope dilution mass spectrometry*, *J Chromatogr A* (2013) 1301, 19-26.
- Fan, Y., Liu, S., Xie, Q. *Rapid determination of phthalate esters in alcoholic beverages by conventional ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction coupled with high performance liquid chromatography*, *Talanta* (2014) 119, 291-298.
- Fernández-González, V., Concha-Graña, E., Muniategui-Lorenzo, S., López-Mahía, P., Prada-Rodríguez, D. *Pressurized hot water extraction coupled to solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments*, *J Chromatogr A* (2008) 1196, 65-72.
- Ferrara, F., Ademollo, N., Delise, M., Fabietti, F., Funari, E. *Alkylphenols and their ethoxylates in seafood from the Tyrrhenian Sea*, *Chemosphere* (2008) 72, 1279-1285.
- Ferrara, F., Fabietti, F., Delise, M., Funari, E. *Alkylphenols and alkylphenol ethoxylates contamination of crustaceans and fishes from the Adriatic Sea (Italy)*, *Chemosphere* (2005) 59, 1145-1150.
- Ferreira-Leach, A.M.R., Hill, E.M. *Bioconcentration and distribution of 4-tert-octylphenol residues in tissues of the rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)*, *Mar Environ Res* (2001) 51, 75-89.
- Fiamegos, Y.C., Stalikas, C.D. *In-drop derivatisation liquid-phase microextraction assisted by ion-pairing transfer for the gas chromatographic determination of phenolic endocrine disruptors*, *Anal Chim Acta* (2007) 597, 32-40.
- Fiedler, S., Foerster, M., Glaser, B., Zech, W. *Alkylphenols in sediments of the Atlantic rainforest south-west of Sao Paulo, Brazil*, *Chemosphere* (2007) 66, 212-218.
- Fischer, A.R., Phuong Lan, N.T., Wiedemann, C., Heide, P., Werner, P., Schmidt, A.W., Theumer, G., Knölker, H.-J. *Determination of 4-nonylphenol in water samples using 4-(2,6-dimethyl-3-yl)phenol as new internal standard*, *J Chromatogr A* (2010) 1217, 2950-2955.
- Gadzala-Kopciuch, R., Filipiak, A., Berecka, B., Gomuka, P., Buszewski, B. *Selection of Extraction Method for the Estimation of the Bioaccumulation Factor of 4-N-Nonylphenol and 4-Tert-Octylphenol in an Aquatic System*, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* (2009) 32, 971-983.
- Gallart-Ayala, H., Moyano, E., Galcerán, M.T. *Liquid chromatography/multi-stage mass spectrometry of bisphenol A and its halogenated derivatives*, *Rapid Commun Mass Sp* (2007) 21, 4039-4048.
- Gallart-Ayala, H., Moyano, E., Galcerán, M.T. *On-line solid phase extraction fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of bisphenol A and its chlorinated derivatives in water samples*, *J Chromatogr A* (2010a) 1217, 3511-3518.
- Gallart-Ayala, H., Moyano, E., Galcerán, M.T. *Recent Advances In Mass Spectrometry Analysis Of Phenolic Endocrine Disruptors And Related Compounds*, *Mass Spectrom Rev* (2010b) 29, 776-805.
- García-López, M., Rodríguez, I., Cela, R. *Pressurized liquid extraction of organophosphate triesters from sediment samples using aqueous solutions*, *J Chromatogr A* (2009) 1216, 6986-6993.
- Gatidou, G., Thomaidis, N.S., Stasinakis, A.S., Lekkas, T.D. *Simultaneous determination of the endocrine disrupting compounds nonylphenol, nonylphenol ethoxylates, triclosan and*

- bisphenol A in wastewater and sewage sludge by gas chromatography-mass spectrometry, *J Chromatogr A* (2007) 1138, 32-41.
- Gatidou, G., Vassalou, E., Thomaidis, N.S. Bioconcentration of selected endocrine disrupting compounds in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*, *Mar Pollut Bull* (2010) 60, 2111-2116.
- Ghosh, R., Hageman, K.J., Bjoerklund, E. Selective pressurized liquid extraction of three classes of halogenated contaminants in fish, *J Chromatogr A* (2011) 1218, 7242-7247.
- Gong, J., Xu, L., Yang, Y., Chen, D.Y., Ran, Y. Sequential ASE extraction of alkylphenols from sediments: Occurrence and environmental implications, *J Hazards Mater* (2011) 192, 643-650.
- Grimalt-Brea, S., Tesis Doctoral: Nuevas aportaciones de LC-MS con analizadores de triple cuadrupolo y tiempo de vuelo en el análisis de residuos de plaguicidas y metabolitos en alimentos de origen vegetal, Universitat Jaume I de Castellón (2009).
- Gross, J.H., *Mass Spectrometry: A Textbook*, 2004.
- Gu, Y.-y., Yu, X.-j., Peng, J.-f., Chen, S.-b., Zhong, Y.-y., Yin, D.-q., Hu, X.-l. Simultaneous solid phase extraction coupled with liquid chromatography tandem mass spectrometry and gas chromatography tandem mass spectrometry for the highly sensitive determination of 15 endocrine disrupting chemicals in seafood, *J Chromatogr B* (2014) 965, 164-172.
- Guitart, C., Readman, J.W. Critical evaluation of the determination of pharmaceutical, personal care products, phenolic endocrine disrupters and faecal steroids by GC/MS and PTV-GC/MS in environmental waters, *Anal Chim Acta* (2010) 658, 32-40.
- Harman, C., Brooks, S., Sundt, R.C., Meier, S., Grung, M. Field comparison of passive sampling and biological approaches for measuring exposure to PAH and alkylphenols from offshore produced water discharges, *Mar Pollut Bull* (2011) 63, 141-148.
- Hauser, B., Popp, P. Membrane-assisted solvent extraction of organochlorine compounds in combination with large-volume injection/gas chromatography-electron capture detection, *J Separ Sci* (2001) 24, 551-560.
- Hawthorne, S.B., Yang, Y., Miller, D.J. Extraction of organic pollutants from environmental solids with subcritical and supercritical water, *Anal Chem* (1994) 66, 2912-2920.
- Herrera-Herrera, A.V., Asensio-Ramos, M., Hernández-Borges, J., Rodríguez-Delgado, M.A. Dispersive liquid-liquid microextraction for determination of organic analytes, *TrAC-Trends Anal Chem* (2010) 29, 728-751.
- Holcapek, M., Jirasko, R., Lisa, M. Recent developments in liquid chromatography-mass spectrometry and related techniques, *J Chromatogr A* (2012) 1259, 3-15.
- Huang, M.J., Jiang, G.B., Cai, Y.Q. Electrochemical preparation of composite polyaniline coating and its application in the determination of bisphenol A, 4-n-nonylphenol, 4-tert-octyl phenol using direct solid phase microextraction coupled with high performance liquid chromatography, *J Separ Sci* (2005) 28, 2218-2224.
- Hussen, A., Westbom, R., Megersa, N., Mathiasson, L., Björklund, E. Selective pressurized liquid extraction for multi-residue analysis of organochlorine pesticides in soil, *J Chromatogr A* (2007) 1152, 247-253.
- Iparraguirre, A., Navarro, P., Prieto, A., Rodil, R., Olivares, M., Fernández, L.-A., Zuloaga, O. Membrane-assisted solvent extraction coupled to large volume injection-gas chromatography-mass spectrometry for the determination of a variety of endocrine disrupting compounds in environmental water samples, *Anal Bioanal Chem* (2012) 402, 2897-2907.

- Iparraguirre, A., Navarro, P., Rodil, R., Prieto, A., Olivares, M., Etxebarria, N., Zuloaga, O. *Matrix effect during the membrane-assisted solvent extraction coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry for the determination of a variety of endocrine disrupting compounds in wastewater*, J Chromatogr A (2014) 1356, 163-170.
- Iparraguirre, A., Prieto, A., Navarro, P., Olivares, M., Fernández, L.-A., Zuloaga, O. *Optimisation of stir bar sorptive extraction and in-tube derivatisation-thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry for the determination of several endocrine disruptor compounds in environmental water samples*, Anal Bioanal Chem (2011) 401, 339-352.
- Jahnke, A., Gandradd, J., Ruck, W. *Simultaneous determination of alkylphenol ethoxylates and their biotransformation products by liquid chromatography/electrospray ionisation tandem mass spectrometry*, J Chromatogr A (2004) 1035, 115-122.
- Jakimska, A., Huerta, B., Barganska, Z., Kot-Wasik, A., Rodriguez-Mozaz, S., Barceló, D. *Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry procedure for determination of endocrine disrupting compounds in fish from Mediterranean rivers*, J Chromatogr A (2013) 1306, 44-58.
- Jiang, Y., Zhang, X., Tang, T., Zhou, T., Shi, G. *Determination of Endocrine Disruptors in Environmental Water by Single-Drop Microextraction and High-Performance Liquid Chromatography*, Anal Lett (2015) 48, 710-725.
- Jiao, Z., Zhang, S., Chen, H. *Determination of tetracycline antibiotics in fatty food samples by selective pressurized liquid extraction coupled with high-performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry*, J Separ Sci (2015) 38, 115-120.
- Jiménez-Díaz, I., Ballesteros, O., Zafra-Gómez, A., Crovetto, G., Vilchez, J.L., Navalón, A., Verge, C., Ferrer, J.A.d. *New sample treatment for the determination of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates in agricultural soils*, Chemosphere (2010) 80, 248-255.
- Jonsson, G., Stokke, T.U., Cavcic, A., Jorgensen, K.B., Beyer, J. *Characterization of alkylphenol metabolites in fish bile by enzymatic treatment and HPLC-fluorescence analysis*, Chemosphere (2008) 71, 1392-1400.
- Kawaguchi, M., Inoue, K., Yoshimura, M., Ito, R., Sakui, N., Nakazawa, H. *Determination of 4-nonylphenol and 4-tert-octylphenol in water samples by stir bar sorptive extraction and thermal desorption gas chromatography mass spectrometry*, Anal Chim Acta (2004) 505, 217-222.
- Klosterhaus, S.L., Grace, R., Hamilton, M.C., Yee, D. *Method validation and reconnaissance of pharmaceuticals, personal care products, and alkylphenols in surface waters, sediments, and mussels in an urban estuary*, Environ Int (2013) 54, 92-99.
- Kojima, M., Matsui, N., Tsunoi, S., Tanaka, M. *Ion-pair solid-phase extractive derivatization of 4-alkylphenols with pentafluoropyridine for gas chromatography-mass spectrometry*, J Chromatogr A (2005) 1078, 1-6.
- Komarek, K., Safarikova, M., Hubka, T., Safarik, I., Kandelova, M., Kujalova, H. *Extraction of Alkylphenols and Nonylphenol Mono- and Diethoxylates from Water Using Magnetically Modified Adsorbents*, Chromatographia (2009) 69, 133-137.
- Koniecko, I., Staniszewska, M., Falkowska, L., Burska, D., Kielczewska, J., Jasinska, A. *Alkylphenols in Surface Sediments of the Gulf of Gdansk (Baltic Sea)*, Water Air Soil Pollut. (2014) 225,
- Kumar, K.S., Sajwan, K.S., Richardson, J.P., Kannan, K. *Contamination profiles of heavy metals, organochlorine pesticides, polycyclic aromatic hydrocarbons and alkylphenols in sediment and oyster collected from marsh/estuarine Savannah GA, USA*, Mar Pollut Bull (2008) 56, 136-149.

- Kurihara, R., Watanabe, E., Ueda, Y., Kakuno, A., Fujii, K., Shiraishi, F., Hashimoto, S. *Estrogenic activity in sediments contaminated by nonylphenol in Tokyo Bay (Japan) evaluated by vitellogenin induction in male mummichogs (Fundulus heteroclitus)*, *Mar Pollut Bull* (2007) 54, 1315-1320.
- Lacorte, S., Raldúa, D., Martínez, E., Navarro, A., Díez, S., Bayona, J.M., Barceló, D. *Pilot survey of a broad range of priority pollutants in sediment and fish from the Ebro river basin (NE Spain)*, *Environ Pollut* (2006) 140, 471-482.
- Li, D., Dong, M., Shim, W.J., Yim, U.H., Hong, S.H., Kannan, N. *Distribution characteristics of nonylphenolic chemicals in Masan Bay environments, Korea*, *Chemosphere* (2008) 71, 1162-1172.
- Li, D.H., Oh, J.R., Park, J. *Direct extraction of alkylphenols, chlorophenols and bisphenol A from acid-digested sediment suspension for simultaneous gas chromatographic-mass spectrometric analysis*, *J Chromatogr A* (2003) 1012, 207-214.
- Li, X., Ying, G.-G., Su, H.-C., Yang, X.-B., Wang, L. *Simultaneous determination and assessment of 4-nonylphenol, bisphenol A and triclosan in tap water, bottled water and baby bottles*, *Environ Int* (2010) 36, 557-562.
- Lien, G.-W., Chen, C.-Y., Wang, G.-S. *Comparison of electrospray ionization, atmospheric pressure chemical ionization and atmospheric pressure photoionization for determining estrogenic chemicals in water by liquid chromatography tandem mass spectrometry with chemical derivatizations*, *J Chromatogr A* (2009) 1216, 956-966.
- Lietti, E., Marin, M.G., Matozzo, V., Polesello, S., Valsecchi, S. *Uptake and elimination of 4-nonylphenol by the clam *Tapes philippinarum**, *Arch Environ Contam Toxicol* (2007) 53, 571-578.
- Lin, C.-Y., Fuh, M.-R., Huang, S.-D. *Application of liquid-liquid microextraction and high-performance liquid chromatography for the determination of alkylphenols and bisphenol-A in water*, *J Separ Sci* (2011) 34, 428-435.
- Lisboa, N.S., Fahning, C.S., Cotrim, G., Dos Anjos, J.P., de Andrade, J.B., Hatje, V., da Rocha, G.O. *A simple and sensitive UFLC-fluorescence method for endocrine disrupters determination in marine waters*, *Talanta* (2013) 117, 168-75.
- Liu, J.-F., Hu, X.-L., Peng, J.-F., Jonsson, J.A., Mayer, P., Jiang, G.-b. *Equilibrium sampling of freely dissolved alkylphenols into a thin film of 1-octanol supported on a hollow fiber membrane*, *Anal Chem* (2006) 78, 8526-8534.
- Liu, J., Wang, R., Huang, B., Lin, C., Wang, Y., Pan, X. *Distribution and bioaccumulation of steroidal and phenolic endocrine disrupting chemicals in wild fish species from Dianchi Lake, China*, *Environ Pollut* (2011) 159, 2815.
- Liu, J.F., Liang, X., Jiang, G.B., Cail, Y.Q., Zhou, Q.X., Liu, G.G. *High performance liquid chromatography determination of 4-nonylphenol, 4-tert-octylphenol, and their short ethoxyl chain polyethoxylates in water samples using a microporous membrane liquid-liquid extraction sample pretreatment technique*, *J Separ Sci* (2003) 26, 823-828.
- Liu, R., Zhou, J.L., Wilding, A. *Microwave-assisted extraction followed by gas chromatography-mass spectrometry for the determination of endocrine disrupting chemicals in river sediments*, *J Chromatogr A* (2004) 1038, 19-26.
- Liu, S., Dasgupta, P.K. *Liquid Droplet. A renewable gas sampling interface*, *Anal Chem* (1995) 67, 2042.
- Liu, X.Y., Zhang, X.Y., Zhang, H.X., Liu, M.C. *A chemometric strategy for optimization of solid-phase microextraction: Determination of bisphenol a and 4-nonylphenol with HPLC*, *J Chromatogr Sci* (2008) 46, 596-600.

- Loos, R., Hanke, G., Umlauf, G., Eisenreich, S.J. *LC-MS-MS analysis and occurrence of octyl- and nonylphenol, their ethoxylates and their carboxylates in Belgian and Italian textile industry, waste water treatment plant effluents and surface waters*, Chemosphere (2007) 66, 690-699.
- Loos, R., Wollgast, J., Castro-Jimenez, J., Mariani, G., Huber, T., Locoro, G., Hanke, G., Umlauf, G., Bidoglio, G., Hohenblum, P., Moche, W., Weiss, S., Schmid, H., Leidecker, F., Ternes, T., Ortega, A.N., Hildebrandt, A., Barcelo, D., Lepom, P., Dimitrova, I., Nitcheva, O., Polesello, S., Valsecchi, S., Boutrup, S., Sortkjaer, O., de Boer, R., Staeb, J. *Laboratory intercomparison study for the analysis of nonylphenol and octylphenol in river water*, TrAC-Trends Anal Chem (2008) 27, 89-95.
- López-Darias, J., Germán-Hernández, M., Pino, V., Afonso, A.M. *Dispersive liquid-liquid microextraction versus single-drop microextraction for the determination of several endocrine-disrupting phenols from seawaters*, Talanta (2010) 80, 1611-1618.
- Lopez-Darias, J., Pino, V., Meng, Y.J., Anderson, J.L., Afonso, A.M. *Utilization of a benzyl functionalized polymeric ionic liquid for the sensitive determination of polycyclic aromatic hydrocarbons, parabens and alkylphenols in waters using solid-phase microextraction coupled to gas chromatography-flame ionization detection*, J Chromatogr A (2010) 1217, 7189-7197.
- López-Roldán, P., de Alda, M.J.L., Barceló, D. *Simultaneous determination of selected endocrine disrupters (pesticides, phenols and phthalates) in water by in-field solid-phase extraction (SPE) using the prototype PROFEXS followed by on-line SPE (PROSPEKT) and analysis by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation-mass spectrometry*, Anal Bioanal Chem (2004) 378, 599-609.
- López de Alda, M.J., Díaz-Cruz, S., Petrovic, M., Barceló, D. *Liquid-chromatography-(tandem)mass spectrometry of selected emerging pollutants (steroid sex hormones, drugs and alkylphenolic surfactants) in the aquatic environment*, J Chromatogr A (2003) 1000, 503-526.
- Loyo-Rosales, J.E., Rosales-Rivera, G.C., Lynch, A.M., Rice, C.P., Torrents, A. *Migration of nonylphenol from plastic containers to water and a milk surrogate*, J Agric Food Chem (2004) 52, 2016-2020.
- Loyo-Rosales, J.E., Schmitz-Afonso, I., Rice, C.P., Torrents, A. *Analysis of octyl- and nonylphenol and their ethoxylates in water and sediments by liquid chromatography/tandem mass spectrometry*, Anal Chem (2003) 75, 4811-4817.
- Luo, J.P., Lei, B.L., Ma, M., Zha, J.M., Wang, Z.J. *Identification of estrogen receptor agonists in sediments from Wenyu River, Beijing, China*, Water Res. (2011) 45, 3908-3914.
- Luo, S., Fang, L., Wang, X., Liu, H., Ouyang, G., Lan, C., Luan, T. *Determination of octylphenol and nonylphenol in aqueous sample using simultaneous derivatization and dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry*, J Chromatogr A (2010) 1217, 6762-6768.
- Llorca-Pórcel, J., Martínez-Parreño, M., Martínez-Soriano, E., Valor, I. *Analysis of chlorophenols, bisphenol-A, 4-tert-octylphenol and 4-nonylphenols in soil by means of ultrasonic solvent extraction and stir bar sorptive extraction with in situ derivatisation*, J Chromatogr A (2009) 1216, 5955-5961.
- Martínez, E., Gans, O., Weber, H., Scharf, S. *Analysis of nonylphenol polyethoxylates and their metabolites in water samples by high-performance liquid chromatography with electrospray mass spectrometry detection*, Water Sci Technol (2004) 50, 157-163.
- Matejicek, D., Grycova, A., Vlcek, J. *The use of molecularly imprinted polymers for the multicomponent determination of endocrine-disrupting compounds in water and sediment*, J Separ Sci (2013) 36, 1097-1103.

- Meier, S., Klungsoyr, J., Boitsov, S., Eide, T., Svoldal, A. *Gas chromatography-mass spectrometry analysis of alkylphenols in cod (Gadus morhua) tissues as pentafluorobenzoate derivatives*, J Chromatogr A (2005) 1062, 255-268.
- Mijangos, L., Bizkarguenaga, E., Prieto, A., Fernandez, L.A., Zuloaga, O. *Simultaneous determination of a variety of endocrine disrupting compounds in carrot, lettuce and amended soil by means of focused ultrasonic solid-liquid extraction and dispersive solid-phase extraction as simplified clean-up strategy*, J Chromatogr A (2015) 1389, 8-18.
- Mortazavi, S., Bakhtiari, A.R., Sari, A.E., Bahramifar, N., Rahbarizade, F. *Phenolic endocrine disrupting chemicals (EDCs) in Anzali Wetland, Iran: Elevated concentrations of 4-nonylphenol, octylphenol and bisphenol A*, Mar Pollut Bull (2012) 64, 1067-1073.
- Mortazavi, S., Bakhtiari, A.R., Sari, A.E., Bahramifar, N., Rahbarizadeh, F. *Occurrence of Endocrine Disruption Chemicals (Bisphenol A, 4-Nonylphenol, and Octylphenol) in Muscle and Liver of Cyprinus Carpio Common, from Anzali Wetland, Iran*, Bull Environ Contamin Toxicol (2013) 90, 578-584.
- Mottaleb, M.A., Usenko, S., O'Donnell, J.G., Ramirez, A.J., Brooks, B.W., Chambliss, C.K. *Gas chromatography-mass spectrometry screening methods for select UV filters, synthetic musks, alkylphenols, an antimicrobial agent, and an insect repellent in fish*, J Chromatogr A (2009) 1216, 815-823.
- Mudiam, M.K.R., Jain, R., Singh, R. *Application of ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction and automated in-port silylation for the simultaneous determination of phenolic endocrine disruptor chemicals in water samples by gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry*, Anal Met (2014) 6, 1802-1810.
- Nakamura, S., Daishima, S. *Simultaneous determination of alkylphenols and bisphenol A in river water by stir bar sorptive extraction with in situ acetylation and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry*, J Chromatogr A (2004) 1038, 291-294.
- Namiésnik, J. *Pro-ecological education* Environ Sci Pollut Res (1999) 6, 243-244.
- Navarro-Ortega, A., Tauler, R., Lacorte, S., Barceló, D. *Occurrence and transport of PAHs, pesticides and alkylphenols in sediment samples along the Ebro River Basin*, J Hydrol (2010) 383, 5.
- Navarro, P., Bustamante, J., Vallejo, A., Prieto, A., Usobiaga, A., Arrasate, S., Anakabe, E., Puy-Azurmendí, E., Zuloaga, O.. *Determination of alkylphenols and 17 β -estradiol in fish homogenate. Extraction and clean-up strategies.*, J Chromatogr A (2010) 1217, 5890-5895.
- Niu, Y.M., Zhang, J., Wu, Y.N., Shao, B. *Simultaneous determination of bisphenol A and alkylphenol in plant oil by gel permeation chromatography and isotopic dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry*, J Chromatogr A (2011) 1218, 5248-5253.
- Padilla-Sánchez, J.A., Plaza-Bolaños, P., Romero-González, R., Barco-Bonilla, N., Martínez-Vidal, J.L., Garrido-Frenich, A. *Simultaneous analysis of chlorophenols, alkylphenols, nitrophenols and cresols in wastewater effluents, using solid phase extraction and further determination by gas chromatography-tandem mass spectrometry*, Talanta (2011) 85, 2397-2404.
- Padilla-Sánchez, J.A., Plaza-Bolaños, P., Romero-González, R., Garrido-Frenich, A., Vidal, J.L.M. *Application of a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe-based method for the simultaneous extraction of chlorophenols, alkylphenols, nitrophenols and cresols in agricultural soils, analyzed by using gas chromatography-triple quadrupole-mass spectrometry/mass spectrometry*, J Chromatogr A (2010) 1217, 5724-5731.
- Pan, Y.-P., Tsai, S.-W. *Solid phase microextraction procedure for the determination of alkylphenols in water by on-fiber derivatization with N-tert-butyl-dimethylsilyl-N-methyltrifluoroacetamide*, Anal Chim Acta (2008) 624, 247-252.

- Pedersen, S.N., Lindholst, C. *Quantification of the xenoestrogens 4-tert-octylphenol and bisphenol A in water and in fish tissue based on microwave assisted extraction, solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry*, J Chromatogr A (1999) 864, 17-24.
- Pena-Abaurrea, M., Ramos, J.J., González, M.J., Ramos, L. *Miniaturized selective pressurized liquid extraction of polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers from feedstuffs*, J Chromatogr A (2013) 1273, 18-25.
- Pena-Pereira, F., Lavilla, I., Bendicho, C. *Liquid-phase microextraction techniques within the framework of green chemistry*, TrAC-Trends Anal Chem (2010) 29, 617-628.
- Peng, X., Wang, Z., Mai, B., Chen, F., Chen, S., Tan, J., Yu, Y., Tang, C., Li, K., Zhang, G., Yang, C. *Temporal trends of nonylphenol and bisphenol A contamination in the Pearl River Estuary and the adjacent South China Sea recorded by dated sedimentary cores*, Sci Total Environ (2007) 384, 393-400.
- Pérez, R.A., Albero, B., Miguel, E., Sánchez-Brunete, C. *Determination of parabens and endocrine-disrupting alkylphenols in soil by gas chromatography-mass spectrometry following matrix solid-phase dispersion or in-column microwave-assisted extraction: a comparative study*, Anal Bioanal Chem (2011) 402, 2347-57.
- Petrovic, M., Barceló, D., Díaz, A., Ventura, F. *Low nanogram per liter determination of halogenated nonylphenols, nonylphenol carboxylates, and their non-halogenated precursors in water and sludge by liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry*, J Amer Soc Mass Spectrom (2003) 14, 516.
- Petrovic, M., Fernández-Alba, A.R., Borrull, F., Marce, R.M., Mazo, E.G., Barceló, D. *Occurrence and distribution of nonionic surfactants, their degradation products, and linear alkylbenzene sulfonates in coastal waters and sediments in Spain*, Environ. Toxicol. Chem. (2002a) 21, 37-46.
- Petrovic, M., Lacorte, S., Viana, P., Barceló, D. *Pressurized liquid extraction followed by liquid chromatography-mass spectrometry for the determination of alkylphenolic compounds in river sediment*, J Chromatogr A (2002b) 959, 15-23.
- Petrovic, M., Sole, M., de Alda, M.J.L., Barcelo, D. *Endocrine disruptors in sewage treatment plants, receiving river waters, and sediments: Integration of chemical analysis and biological effects on feral carp*, Environ. Toxicol. Chem. (2002c) 21, 2146-2156.
- Pintado-Herrera, M.G., Gonzalez-Mazo, E., Lara-Martin, P.A. *Environmentally friendly analysis of emerging contaminants by pressurized hot water extraction-stir bar sorptive extraction-derivatization and gas chromatography-mass spectrometry*, Anal Bioanal Chem (2013a) 405, 401-411.
- Pintado-Herrera, M.G., González-Mazo, E., Lara-Martín, P.A. *Environmentally friendly analysis of emerging contaminants by pressurized hot water extraction-stir bar sorptive extraction-derivatization and gas chromatography-mass spectrometry*, Anal Bioanal Chem (2013b) 405, 401-411.
- Pojana, G., Gomiero, A., Jonkers, N., Marcomini, A. *Natural and synthetic endocrine disrupting compounds (EDCs) in water, sediment and biota of a coastal lagoon*, Environ Int (2007) 33, 929.
- Pothitou, P., Voutsas, D. *Endocrine disrupting compounds in municipal and industrial wastewater treatment plants in Northern Greece*, Chemosphere (2008) 73, 1716-1723.
- Prieto, A., Schrader, S., Moeder, M. *Determination of organic priority pollutants and emerging compounds in wastewater and snow samples using multiresidue protocols on the basis of microextraction by packed sorbents coupled to large volume injection gas chromatography-mass spectrometry analysis*, J Chromatogr A (2010) 1217, 6002-6011.

- Prieto, A., Vallejo, A., Zuloaga, O., Paschke, A., Sellergen, B., Schillinger, E., Schrader, S., Moëder, M. *Selective determination of estrogenic compounds in water by microextraction by packed sorbents and a molecularly imprinted polymer coupled with large volume injection-in-port-derivatization gas chromatography-mass spectrometry*, *Anal Chim Acta* (2011) 703, 41.
- Quintana, J.B., Rodil, R., Muniategui-Lorenzo, S., López-Mahía, P., Prada-Rodríguez, D. *Multiresidue analysis of acidic and polar organic contaminants in water samples by stir-bar sorptive extraction-liquid desorption-gas chromatography-mass spectrometry*, *J Chromatogr A* (2007) 1174, 27-39.
- Reid, A.M., Brougham, C.A., Fogarty, A.M., Roche, J.J. *Accelerated solvent-based extraction and enrichment of selected plasticisers and 4-nonylphenol, and extraction of tin from organotin sources in sediments, sludges and leachate soils*, *Anal Chim Acta* (2009) 634, 197-204.
- Rezaee, M., Assadi, Y., Hosseini, M.-R., Aghaee, E., Ahmadi, F., Berijani, S. *Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction*, *J Chromatogr A* (2006) 1116, 1-9.
- Rezaee, M., Yamini, Y., Shariati, S., Esrafil, A., Shamsipur, M. *Dispersive liquid-liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography-UV detection as a very simple, rapid and sensitive method for the determination of bisphenol A in water samples*, *J Chromatogr A* (2009) 1216, 1511-1514.
- Richter, P., Leiva, C., Choque, C., Giordano, A., Sepulveda, B. *Rotating-disk sorptive extraction of nonylphenol from water samples*, *J Chromatogr A* (2009) 1216, 8598-8602.
- Richter, P., Sepulveda, B., Oliva, R., Calderon, K., Seguel, R. *Screening and determination of pesticides in soil using continuous subcritical water extraction and gas chromatography - mass spectrometry*, *J Chromatogr A* (2003) 994, 169-177.
- Rodil, R., Schellin, M., Popp, P. *Analysis of polycyclic-aromatic hydrocarbons in water and beverages using membrane-assisted solvent extraction in combination with large volume injection-gas chromatography-mass spectrometric detection*, *J Chromatogr A* (2007) 1163, 288-297.
- Rodil, R., Schrader, S., Moeder, M. *Non-porous membrane-assisted liquid-liquid extraction of UV filter compounds from water samples*, *J Chromatogr A* (2009) 1216, 4887-4894.
- Ros, O., Vallejo, A., Blanco-Zubiaguirre, L., Olivares, M., Delgado, A., Etxebarria, N., Prieto, A. *Microextraction with polyethersulfone for bisphenol-A, alkylphenols and hormones determination in water samples by means of gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis*, *Talanta* (2015) 134, 247-55.
- Salgueiro-González, N., Concha-Graña, E., Turnes-Carou, I., Muniategui-Lorenzo, S., López-Mahía, P., Prada-Rodríguez, D. *Determination of alkylphenols and bisphenol A in seawater samples by dispersive liquid-liquid microextraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry for compliance with Environmental Quality Standards (Directive 2008/105/EC)*, *J Chromatogr A* (2012) 1223, 1-8.
- Salgueiro-González, N., Turnes-Carou, I., Muniategui-Lorenzo, S., López-Mahía, P., Prada-Rodríguez, D. *Membrane assisted solvent extraction coupled with liquid chromatography tandem mass spectrometry applied to the analysis of alkylphenols in water samples*, *J Chromatogr A* (2013) 1281, 46-53.
- Sánchez-Avila, J., Fernandez-Sanjuan, M., Vicente, J., Lacorte, S. *Development of a multi-residue method for the determination of organic micropollutants in water, sediment and mussels using gas chromatography-tandem mass spectrometry*, *J Chromatogr A* (2011) 1218, 6799.
- Schellin, M., Hauser, B., Popp, P. *Determination of organophosphorus pesticides using membrane-assisted solvent extraction combined with large volume injection-gas chromatography-mass spectrometric detection*, *J Chromatogr A* (2004) 1040, 251-258.

- Schmitz-Afonso, I., Loyo-Rosales, J.E., Avilés, M.D., Rattner, B.A., Rice, C.P. *Determination of alkylphenol and alkylphenolethoxylates in biota by liquid chromatography with detection by tandem mass spectrometry and fluorescence spectroscopy*, J Chromatogr A (2003) 1010, 25-35.
- Senthil Kumar, K., Sajwan, K.S., Richardson, J.P., Kannan, K. *Contamination profiles of heavy metals, organochlorine pesticides, polycyclic aromatic hydrocarbons and alkylphenols in sediment and oyster collected from marsh/estuarine Savannah GA, USA*, Mar Pollut Bull (2008) 56, 136-49.
- Shao, B., Han, H., Li, D.M., Ma, Y., Tu, X.M., Wu, Y.G. *Analysis of alkylphenol and bisphenol A in meat by accelerated solvent extraction and liquid chromatography with tandem mass spectrometry*, Food Chem (2007) 105, 1236-1241.
- Shih, H.-K., Shu, T.-Y., Ponnusamy, V.K., Jen, J.-F. *A novel fatty-acid-based in-tube dispersive liquid-liquid microextraction technique for the rapid determination of nonylphenol and 4-tert-octylphenol in aqueous samples using high-performance liquid chromatography-ultraviolet detection*, Anal Chim Acta (2015) 854, 70-77.
- Snyder, S.A., Keith, T.L., Naylor, C.G., Staples, C.A., Giesy, J.P. *Identification and quantitation method for nonylphenol and lower oligomer nonylphenol ethoxylates in fish tissues*, Environ. Toxicol. Chem. (2001) 20, 1870-1873.
- Stuart, J.D., Capulong, C.P., Launer, K.D., Pan, X. *Analyses of phenolic endocrine disrupting chemicals in marine samples by both gas and liquid chromatography-mass spectrometry*, J Chromatogr A (2005) 1079, 136-145.
- Subedi, B., Aguilar, L., Williams, E.S., Brooks, B.W., Usenko, S. *Selective pressurized liquid extraction technique capable of analyzing dioxins, furans, and PCBs in clams and crab tissue*, Bull Environ Contamin Toxicol (2014) 92, 460-465.
- Subedi, B., Mottaleb, M.A., Chambliss, C.K., Usenko, S. *Simultaneous analysis of select pharmaceuticals and personal care products in fish tissue using pressurized liquid extraction combined with silica gel cleanup*, J Chromatogr A (2011) 1218, 6278-6284.
- Sung, Y.-H., Liu, C.-H., Leong, M.-I., Huang, S.-D. *Determination of alkylphenols in water by dispersive liquid-liquid microextraction on solid formation without a disperser*, Anal Lett (2014) 47, 2643-2654.
- Tan, B.L.L., Hawker, D.W., Mueller, J.F., Tremblay, L.A., Chapman, H.F. *Stir bar sorptive extraction and trace analysis of selected endocrine disruptors in water, biosolids and sludge samples by thermal desorption with gas chromatography-mass spectrometry*, Water Research (2008) 42, 404-412.
- Tavazzi, S., Benfenati, E., Barcelo, D. *Accelerated solvent extraction then liquid chromatography coupled with mass spectrometry for determination of 4-t-octyl phenol, 4-nonylphenols, and bisphenol A in fish liver*, Chromatographia (2002) 56, 463-467.
- Teo, C.C., Tan, S.N., Yong, J.W.H., Hew, C.S., Ong, E.S. *Pressurized hot water extraction (PHWE)*, J Chromatogr A (2010) 1217, 2484-2494.
- Tsuda, T., Suga, K., Kaneda, E., Ohsuga, M. *Determination of 4-nonylphenol, nonylphenol monoethoxylate, nonylphenol diethoxylate and other alkylphenols in fish and shellfish by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection*, J Chromatogr B (2000) 746, 305-309.
- Vallejo, A., Usobiaga, A., Ortiz-Zarragoitia, M., Cajarville, M.P., Fernández, L.A., Zuloaga, O. *Focused ultrasound-assisted acceleration of enzymatic hydrolysis of alkylphenols and 17 beta-oestradiol glucuronide in fish bile*, Anal Bioanal Chem (2010) 398, 2307-2314.

- Van Emon, J.M., Chuang, J.C., Bronshtein, A., Altstein, M. *Determination of polychlorinated biphenyls in soil and sediment by selective pressurized liquid extraction with immunochemical detection*, *Sci Total Environ* (2013) 463-464, 326-333.
- Villar-Navarro, M., Ramos-Payan, M., Fernández-Torres, R., Callejón-Mochón, M., Bello-López, M.A. *A novel application of three phase hollow fiber based liquid phase microextraction (HF-LPME) for the HPLC determination of two endocrine disrupting compounds (EDCs), n-octylphenol and n-nonylphenol, in environmental waters*, *Sci Total Environ* (2013) 443, 1-6.
- Wang, J., Dong, M., Shim, W.J., Kannan, N., Li, D. *Improved cleanup techniques for gas chromatographic-mass spectrometric determination of alkylphenols from biota extract*, *J Chromatogr A* (2007) 1171, 15-21.
- Wang, J., Pan, H., Liu, Z., Fe, F. *Ultra-high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of alkylphenols in soil*, *J Chromatogr A* (2009) 1216,
- Wenzel, A., Bohmer, W., Muller, J., Rudel, H., Schroter-Kermani, C. *Retrospective monitoring of alkylphenols and alkylphenol monoethoxylates in aquatic biota from 1985 to 2001: Results from the German Environmental Specimen Bank*, *Environ Sci Technol* (2004) 38, 1654-1661.
- Yiantzi, E., Psillakis, E., Tyrovolas, K., Kalgerakis, N. *Vortex-assisted liquid-liquid microextraction of octylphenol, nonylphenol and bisphenol-A*, *Talanta* (2010) 80, 2057-2062.
- Yu, Y., Xu, J., Sun, H.W., Dai, S.G. *Sediment-porewater partition of nonylphenol polyethoxylates: Field measurements from Lanzhou Reach of Yellow River, China*, *Arch Environ Contamin Toxicol* (2008) 55, 173-179.
- Zgola-Grzeskowiak, A. *Dispersive liquid-liquid microextraction applied to isolation and concentration of alkylphenols and their short-chained ethoxylates in water samples*, *J Chromatogr A* (2010) 1217, 1761-1766.
- Zhang, P., Shi, Z.G., Yu, Q.Y., Feng, Y.Q. *A new device for magnetic stirring-assisted dispersive liquid-liquid microextraction of UV filters in environmental water samples*, *Talanta* (2011) 83, 1711-1715.
- Zhang, S., You, J., Song, C., Chen, G., Suo, Y. *Purification and determination of bisphenol A and alkylphenol in river sediments by high performance liquid chromatography with fluorescence detection*, *Anal Met* (2012) 4, 4030-4036.
- Zhang, X., Gao, Y., Li, Q., Li, G., Guo, Q., Yan, C. *Estrogenic Compounds and Estrogenicity in Surface Water, Sediments, and Organisms from Yundang Lagoon in Xiamen, China*, *Arch Environ Contamin Toxicol* (2011) 61, 93.
- Zhang, Z., Hibberd, A., Zhou, J.L. *Analysis of emerging contaminants in sewage effluent and river water: comparison between spot and passive sampling*, *Anal Chim Acta* (2008) 607, 37-44.
- Zhang, Z., Ren, N., Kannan, K., Nan, J., Liu, L., Ma, W., Qi, H., Li, Y. *Occurrence of Endocrine-Disrupting Phenols and Estrogens in Water and Sediment of the Songhua River, Northeastern China*, *Arch Environ Contam Toxicol* (2014) 66, 361-369.
- Zhang, Z., Rhind, S.M., Kerr, C., Osprey, M., Kyle, C.E. *Selective pressurized liquid extraction of estrogenic compounds in soil and analysis by gas chromatography-mass spectrometry*, *Anal Chim Acta* (2011) 685, 29-35.
- Zhao, M., van der Wielen, F., de Voogt, P. *Optimization of a matrix solid-phase dispersion method with sequential clean-up for the determination of alkylphenol ethoxylates in biological tissues*, *J Chromatogr A* (1999) 837, 129-138.
- Zhou, Q., Gao, Y., Xie, G. *Determination of bisphenol A, 4-n-nonylphenol, and 4-tert-octylphenol by temperature-controlled ionic liquid dispersive liquid-phase microextraction combined with high performance liquid chromatography-fluorescence detector*, *Talanta* (2011) 85, 1598.

Sección II

Metodología analítica

Resumen: En la sección II Metodología Analítica se proponen nuevos métodos analíticos para la determinación de alquilfenoles y bisfenol A en distintas muestras ambientales (agua, sedimento y biota) a niveles traza, cumpliendo con los criterios establecidos en la Directiva 2013/39/UE.

Como técnica de determinación instrumental se selecciona la cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem, de gran selectividad y sensibilidad. Las técnicas de extracción y/o purificación desarrolladas son técnicas sostenibles, caracterizadas por el uso de un volumen reducido de disolventes y reactivos tóxicos, la poca cantidad (o nula) de residuos generados y el bajo tiempo de análisis empleado. Algunas son miniaturizadas, por lo que requieren poco volumen de muestra, facilitando las etapas de muestreo, transporte y almacenamiento. Otras son parcialmente automatizadas, con una mínima manipulación de muestra por parte del analista, lo que reduce los problemas de contaminación. Por otra parte, y debido a su importancia en la determinación analítica se ha realizado también un amplio estudio sobre el pre- y el tratamiento de muestras acuosas, con especial atención a los problemas de contaminación de blancos asociados a estos compuestos.

La sección se divide en tres capítulos, cada uno de los cuales se centra en el análisis de estos compuestos en una determinada matriz: agua (Capítulo III), sedimento (Capítulo IV) y biota (Capítulo V). En ellos se recoge el desarrollo, el estudio de validación y la aplicación a muestras de cada metodología propuesta, comentando sus ventajas y aportaciones con respecto a los métodos previamente publicados para el mismo fin.

Summary: Analytical methodologies developed for the analysis of alkylphenols and bisphenol A in water, sediment and biota samples at trace levels in compliance with the Directive 2013/39/EU, are shown in the Analytical Methodology Section.

In this work, liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry was chosen as an instrumental technique because of its sensitivity and selectivity. Green techniques were employed in the extraction and clean up steps, characterized by low volume of toxic solvents and/or reagents, low amount of waste generated and low analysis time. Some of them are miniaturized techniques which required small amount of sample (easier sampling, transport and storage). Automatic techniques were also employed (minimum sample handling) minimizing blank contamination problems. Furthermore, different aspects about the pretreatment and treatment of aqueous samples were also considered because of their importance in the analytical determination, especially blank contamination problems associated to these compounds.

This section was divided in three Chapters where the analysis of the target compounds in water (Chapter III), sediment (Chapter IV) and biota (Chapter V) was considered. The optimization and the validation study of the proposed methods and its application to real samples were described in each Chapter; moreover, a comparison between the developed methodologies with other methods found in the literature based on the same topic was included.

CAPÍTULO III. Análisis de alquilfenoles y bisfenol A en agua



- *Desarrollo y validación de dos métodos basados en técnicas de microextracción líquido-líquido para la determinación de alquilfenoles y bisfenol A a niveles traza*
- *Metodologías sensibles, selectivas, rápidas, sencillas, automáticas y sostenibles con las que se han obtenido parámetros de calidad analítica satisfactorios*
- *Nonilfenol determinado en la mayoría de las muestras analizadas, incluso en agua de abastecimiento*

Publicaciones científicas

“Determination of alkylphenols and bisphenol A in seawater samples by dispersive liquid-liquid microextraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry for the compliance with environmental quality standards (Directive 2008/105/EC)”.

N.Salgueiro-González, E. Concha-Graña, I. Turnes-Carou, S. Muniategui-Lorenzo, P. López-Mahía, D. Prada-Rodríguez. *J Chromatogr A* (2012) 1223, 1-8. Anexo I (págs. 281 - 290)

“Blank and sample handling troubleshooting in ultratrace analysis of alkylphenols and bisphenol A by liquid chromatography tandem mass spectrometry”.

N.Salgueiro-González, E. Concha-Graña, I. Turnes-Carou, S. Muniategui-Lorenzo, P. López-Mahía, D. Prada-Rodríguez. *Talanta* (2012) 101, 413-419. Anexo II (págs. 291 - 300)

“Membrane assisted solvent extraction coupled with liquid chromatography tandem mass spectrometry applied to the analysis of alkylphenols in water samples”.

N.Salgueiro-González, I. Turnes-Carou, S. Muniategui-Lorenzo, P. López-Mahía, D. Prada-Rodríguez. *J Chromatogr A* (2013) 1281, 46-53. Anexo III (págs. 301 - 310)

El análisis de disruptores endocrinos, como los alquilfenoles y bisfenol A, en el medio acuático es necesario para preservar el ecosistema y proteger la salud humana. Dado que estos compuestos entran en el medio ambiente, principalmente, a través de los efluentes de las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) o de descargas industriales, el agua es el compartimento ambiental más afectado. Por ello, la Directiva 2013/39/UE incluye a los APs en la lista de las 45 sustancias prioritarias en política de aguas; aunque el BPA no está considerado como contaminante prioritario, su análisis en esta matriz es también interesante.

El estudio de APs y BPA en aguas superficiales y otras aguas (como la de mar) responde a uno de los parámetros químicos de control que garantiza el buen estado del medio acuático. Mientras que la presencia de estos EDCs en aguas superficiales ha sido ampliamente demostrada, las investigaciones sobre el medio marino son todavía escasas [David *y cols.*, 2010; Ying *y cols.*, 2002]. Igualmente, el análisis de estos contaminantes en aguas de consumo es importante, pues concentraciones elevadas podrían suponer un riesgo para la salud humana por ingestión, dado su carácter estrogénico. Aunque estos compuestos no están incluidos en la Directiva 98/83/CE de aguas de consumo [Directiva-98/83/CE], el agua está en contacto con material plástico durante la fabricación de alimentos, en los sistemas de abastecimiento de las casas, etc., pudiendo tener lugar la migración de estos compuestos desde las paredes de los recipientes de plástico hasta el agua.

Para la determinación de estos EDCs en los distintos tipos de aguas y a las bajas concentraciones recogidas en la legislación ($\mu\text{g/L}$) es necesario disponer de métodos de elevada sensibilidad y selectividad. Si además se desea incorporar estos métodos a programas de control y monitorización ambiental, se buscan otros requisitos como la sencillez, rapidez, cantidad de muestra utilizada, etc.

En este Capítulo se desarrollan dos métodos analíticos novedosos, selectivos, sensibles, miniaturizados y sostenibles para la determinación de alquilfenoles y bisfenol A en aguas, que permiten evaluar la presencia y distribución de estos compuestos en el medio acuático. En primer lugar se detalla la optimización y validación del método instrumental de cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), gracias al cual se pueden alcanzar bajos límites de cuantificación. Posteriormente, se comenta cada metodología haciendo hincapié en su desarrollo, validación y aplicación a muestras. La primera de ellas se basa en una microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) y la segunda en una extracción con disolvente miniaturizada asistida por membranas (MASE). Finalmente se muestra una comparativa de ambos métodos, demostrando las mejoras con respecto a los métodos previos encontrados en la bibliografía.

1. REACTIVOS, MATERIAL E INSTRUMENTACIÓN

Los patrones individuales de los EDCs bajo estudio son los siguientes: 4-*n*-octilfenol (99%), 4-*tert*-octilfenol (97%) y bisfenol A (99%) de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania), y 4-*n*-nonilfenol (99%) y nonilfenol mezcla técnica (94%) de Riedel-de Haën. (Seelze, Alemania). En cuanto a los patrones marcados isotópicamente (deuterados), se utilizan el 4-*n*-nonilfenol 2,3,5,6- d_4 , OD (99,3%) de CDN Isotopes (Pointe-Claire, Canadá) y el bisfenol A- d_{16} , disolución en acetonitrilo (99,5%), de Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Alemania).

El equipo empleado es un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Applied Biosystems of Life Technologies API3200 (Carlsbad, CA, USA) acoplado a sistema HPLC Agilent 1200, con bomba binaria, inyector automático, horno de columnas termostatzado e interfase de ionización ESI y APCI de Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA). La separación cromatográfica se lleva a cabo con una columna Hypersil Gold C_{18} 150 x 2,1 mm (3 μ m partícula), de Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA). Para la inyección se utilizan viales de vidrio de 1 mL con tapa de rosca y septum de PTFE/silicona de Waters (Milford, MA, USA). Como fase móvil se emplea metanol LC-MS PAI de Panreac (Barcelona, España), agua ultrapura (resistividad específica=18 $M\Omega$ /cm), de Millipore Corp. (Bedford, MA, USA) y amoníaco 30% calidad para análisis de residuos, de Panreac (Barcelona, España).

Para la limpieza del material se utiliza acetona Químicamente Pura QP (Barcelona, España) y metanol 205, calidad SPS de Romil Ltd (Cambridge, Reino Unido). Los ensayos de filtración de muestra se realizan con filtros 0,6 μ m de fibra de vidrio MN GF-6 de Macherey Nagel (Düren, Alemania); 0,45 μ m de celulosa y filtros de membrana de Nylon, GNWP 0,2 μ m de Millipore (Bedford, MA, USA). Para la filtración de los extractos orgánicos se prueban filtros Iso-Disc™ N-13-2, (Nylon 0,2 μ m) de Supelco (Bellefonte, PA, USA); filtros de politetrafluoroetileno (PTFE) 0,2 μ m de Teknokroma (Barcelona, España); y filtros de fluoruro de polivinilideno (PVDF) 0,45 μ m Millex® HV de Millipore (Carringtonwohill, Irlanda).

La microextracción líquido-líquido dispersiva se lleva a cabo utilizando un agitador Janke&Kunkel VIBRAX-VXR, de IKA (Staufen, Alemania); y una Centrífuga 5804, de Eppendorf (Madrid, España) y tubos de centrífuga de 50 mL Pobel (Madrid, España). El dispositivo para la microextracción con disolvente miniaturizada asistida por membranas, que consiste en un vial de vidrio de 20 mL en el que se inserta una membrana de polipropileno (4 cm de largo; 0,03 mm de grosor y 6 mm de diámetro interno), es de Gerstel (Mülheim, Alemania). Como disolventes de extracción se seleccionan 1-Octanol, Chromasolv® para HPLC (99%), de Sigma-Aldrich Co. (Madrid, España) para la DLLME, hexano para análisis traza (UniSolv®) de Merck (Darmstadt, Germany) para la MASE y metanol 205, calidad SPS de Romil Ltd (Cambridge, Reino Unido) para la preparación de los extractos finales.

2. DESARROLLO DE UN MÉTODO INSTRUMENTAL DE CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM (LC-MS/MS)

Para el desarrollo del método instrumental se han tenido en cuenta las variables del espectrómetro de masas, las de la fuente de ionización por electrospray (ESI) y las que influyen en la separación cromatográfica. La optimización de aquellas de mayor importancia, llevadas a cabo de un modo uni- o multivariante según el caso, se muestra a lo largo de este apartado.

2.1. Optimización de las variables del espectrómetro de masas

Los parámetros relacionados con el espectrómetro de masas que se consideran son: los iones precursor (Q1M) y producto (Q3M), característicos de cada compuesto; el tiempo de barrido (t), intervalo en el que se produce la lectura de masas; y distintos potenciales aplicados a la entrada y/o salida de los cuadrupolos que permiten el desplazamiento de los iones a lo largo del analizador, como son el potencial de *declustering* (DP), el potencial de entrada (EP), el potencial energía de colisión (CEP), el potencial de salida de la celda (CXP) y la energía de colisión (CE).

Para la elección de los valores óptimos de cada variable se lleva a cabo una infusión directa de cada uno de los compuestos y sus análogos deuterados (Figura 15), utilizados como patrones internos para corregir las posibles variaciones que tienen lugar en la determinación instrumental. En el caso de los APs se emplea el 4-*n*-nonilfenol- d_4 , OD (4-*n*-NP- d_4). Mientras que para el BPA se utiliza el bisfenol A- d_{16} (BPA- d_{16}). En la Tabla 12 se muestran los valores obtenidos con el software Analyst 1.4.2 para cada una de las variables.

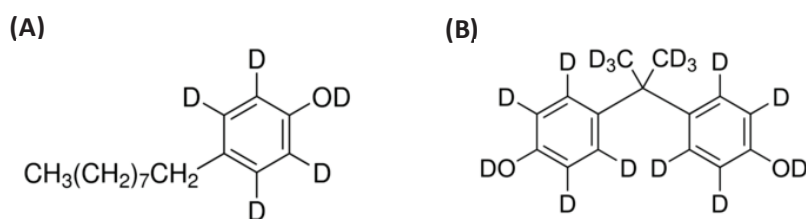


Figura 15. Estructura química de los compuestos deuterados utilizados en este trabajo: (A) 4-*n*-nonilfenol- d_4 , OD y (B) bisfenol A- d_{16}

Como se puede observar, para cada compuesto se seleccionan dos transiciones: la de mayor intensidad, marcada en la Tabla 12 con un asterisco, se utiliza para la cuantificación del compuesto, mientras que la de menor intensidad se emplea para su identificación y/o confirmación. De este modo, se tienen para cada compuesto cuatro puntos de identificación (1 puntos por ion precursor y 1,5 puntos por ion producto), uno más del establecido por la Decisión de la Comisión 2002/657/CE [Decisión-2002/657] para las sustancias grupo B del Anexo I de la Directiva 96/23/CE [Directiva-96/23/CE, 1996], en el que se incluyen los APs y el

BPA. El 4-*n*-OP es la excepción, pues se ha establecido una única transición (2,5 puntos de identificación) debido a la presencia de una interferencia en la transición de confirmación (concretamente la 205>189). Este hecho ha sido mencionado previamente por otros autores [Ying y cols., 2002].

Tabla 12. Resultados obtenidos en la optimización de las variables del masas para cada compuesto (t en msec y voltajes en V)

Compuesto	Q1M	Q3M	t	DP	EP	CEP	CE	CXP
BPA	227	212*	30	-40	-9	-16	-24	-4
		133	30	-40	-9	-16	-32	-2
BPA-d ₁₆	241	142*	30	-45	-9.5	-38	-44	-4
		221	30	-45	-9.5	-38	-46	-4
4-tOP	205	133*	30	-45	-10.5	-14	-30	-2
		116	30	-45	-10.5	-14	-76	0
NP	219	133*	30	-40	-6	-14	-38	-2
		116	30	-40	-6	-14	-74	-2
4- <i>n</i> -OP	205	106*	30	-50	-6.5	-14	-26	-2
		-	-	-	-	-	-	-
4- <i>n</i> -NP	219	106*	30	-45	-8.5	-14	-28	0
		119	30	-45	-8.5	-14	-44	-4
4- <i>n</i> -NP-d ₄	223	109*	30	-45	-10.5	-32	-28	-4
		129	30	-45	-10.5	-32	-46	-2

Q1M, ion precursor; Q3M, ion producto; t, tiempo de barrido (s); DP, potencial de *declustering* (V); EP, potencial de entrada (V); CEP, potencial energía de colisión (V); CE, energía de colisión (V) y CXP, potencial de salida de la celda (V)

*Transición de mayor intensidad utilizada para cuantificación de los compuestos

El ion precursor obtenido se corresponde, en todos los casos, con la pérdida de un protón; es decir equivalen al MW de cada compuesto menos la unidad (MW del hidrógeno). Las transiciones obtenidas en el caso de los alquilfenoles indican que la fragmentación tiene lugar en la cadena carbonada de los compuestos [Careri y cols., 2003]. El 4-*n*-NP y el 4-*n*-OP son isómeros lineales, cuyo ion producto predominante es el 106; en la fragmentación se pierden el grupo metilo y (n-1) grupos CH₂ de la cadena carbonada, dando lugar a las estructuras (M-H-(CH₂)₇-CH₃)⁺ y (M-H-(CH₂)₆-CH₃)⁺ respectivamente, donde M es el ion precursor. Por su parte, los isómeros de cadena ramificada (4-tOP y NP) presentan como ion producto predominante el 133, correspondiente a la fragmentación de los iones en la posición α al anillo fenólico [Loyo-Rosales y cols., 2003]. En el caso del BPA las transiciones 227>133 y 227>212 se corresponden con los iones (M-H-C₆H₆O)⁺ y (M-H-CH₃)⁺ [Gallart-Ayala y cols., 2010].

En cuanto a los compuestos deuterados, cabe destacar el comportamiento del bisfenol A-d₁₆ (MW 244 g/mol) cuyo ion precursor es 241 m/z en vez de 242 m/z, que correspondería a la pérdida de un deuterio. Esto es debido a que el compuesto intercambia un protón con el medio, convirtiéndose en bisfenol A-d₁₅ antes de la ionización; una vez producido el intercambio deuterio-hidrógeno, se ioniza el

compuesto [Inoue *y cols.*, 2002]. Tras la fragmentación, se observa como ion producto predominante el 142 con estructura (M-D-C₆D₆O)⁻. Para el 4-*n*-NP-d₄ (MW 225 g/mol) se obtiene como ion precursor 223 y como ion producto mayoritario el 109, debido a la pérdida del deuterio del grupo hidroxilo y a la pérdida de un grupo metilo y ocho grupos CH₂ de la cadena carbonada (M-D-H-(CH₂)₇-CH₃)⁻, respectivamente.

2.2. Optimización de las variables que afectan a la ionización

Uno de los parámetros que más influyen en la ionización es el voltaje aplicado en la fuente de ionización. En este caso se emplea -4,5 kV que es el mayor potencial que permite el equipo utilizado al trabajar con ESI negativo. El resto de variables, como la temperatura, la distancia del capilar a la fuente o los flujos de los gases necesarios para que los iones en fase gas se desplacen a través del espectrómetro de masas (gas nebulizador, *curtain* gas y gas de colisión) se estudian de modo multivariante, planteando un diseño de experiencias Plackett-Burman 2⁷x3/32 aleatorio, con ayuda del software Statgraphics Plus 5.0 para Windows. De esta manera se reduce el número de ensayos necesarios para la optimización de esta parte del método instrumental.

Los valores máximos y mínimos de cada variable -Tabla 13- se han establecido de acuerdo con los conocimientos previos y limitaciones del equipo, así como las características de los compuestos que se analizan. Debido a la complejidad de la mezcla técnica de isómeros del NP, en este diseño sólo se han incluido el BPA, 4-*t*OP, 4-*n*-OP y 4-*n*-NP.

Tabla 13. Valores máximos y mínimos de las variables a optimizar en el diseño de experiencias

	Variables	Unidades	Mínimo	Máximo
A	Porcentaje AcNH ₄ fases	mM	0	10
B	Temperatura fuente	°C	200	650
C	Flujo gas nebulizador 1 (N ₂)	psi	20	60
D	Flujo gas cortina	psi	10	30
E	Flujo gas colisión (N ₂)	psi	0	10
F	Distancia capilar	mm	5	10
G	Fantasma	-	-1	1

Los ensayos se realizan por triplicado, inyectando patrones individuales mediante *flow injection analysis* utilizando como fase móvil una mezcla metanol:agua (50:50). Tras el tratamiento de datos, se obtienen las cartas Pareto de primer orden (P=95%), mostradas en la Figura 16. En el caso del BPA no se observan variables significativas; sin embargo, el modificador de la fase móvil y el gas de colisión son las variables con mayor influencia, de una forma negativa y positiva, respectivamente. Los tres APs estudiados muestran un comportamiento similar: el gas de colisión es la

única variable significativa, la cual influye positivamente. Las cartas Pareto de segundo orden no muestran interacciones entre las variables estudiadas.

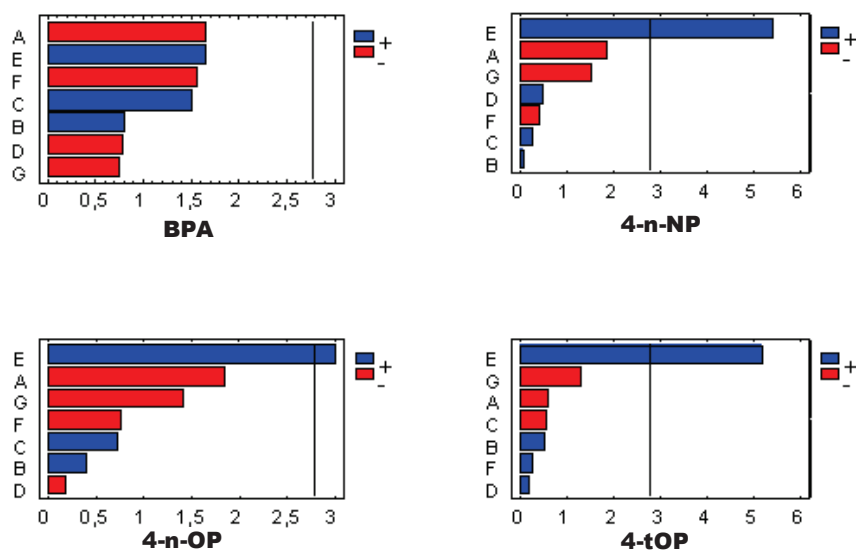


Figura 16. Cartas Pareto de primer orden obtenidas en el diseño, para los compuestos indicados, donde las variables son A: Porcentaje de modificador, B: Temperatura, C: Flujo gas nebulizador 1, D: Flujo gas cortina, E: Flujo gas colisión, F: Distancia capilar y G: Fantasma

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se fija como valor óptimo de flujo de gas de colisión el máximo permitido (12 psi) debido a su influencia positiva en la ionización. Los valores de las variables no significativas se han escogido teniendo en cuenta el signo del efecto estimado, así como condiciones y limitaciones instrumentales: flujo de gas cortina 10 psi, flujo de gas nebulizador 35 psi, flujo de gas auxiliar 35 psi y temperatura de la fuente 650°C. El modificador de la fase móvil y la distancia del capilar a la fuente se optimizan de modo univariante en ensayos posteriores.

Para la optimización del modificador de la fase móvil se comparan la señal obtenida sin utilizar ningún aditivo con las mostradas utilizando diferentes modificadores: ácido acético (pH ácido), acetato amónico (pH neutro) y amoníaco (pH básico), como se muestra en la Figura 17. La respuesta proporcionada por el amoníaco es diez veces mayor que la de otros modificadores para los alquilfenoles; esto es debido probablemente a que un pH básico (pH~8) favorece la pérdida del protón, desplazando el equilibrio hacia la formación del anión hidroxilo. Aunque en el caso del BPA esta mejoría no es tan notable, se selecciona amoníaco como modificador de la fase móvil. Tras la elección, se estudia también la concentración de modificador (de 0 a 0,1% v/v), eligiéndose un 0,05%, ya que, a igual respuesta obtenida, un volumen menor de modificador minimiza los posibles daños en la columna y en el equipo con el paso del tiempo.

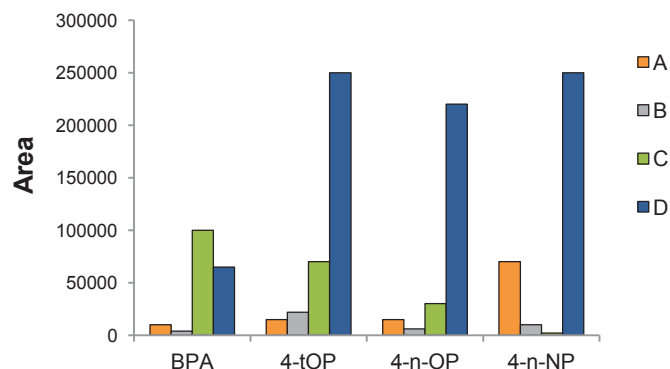


Figura 17. Estudio de la adición de modificadores a la fase móvil: A) 0% modificador, B) 0,5% ácido acético, C) 2,5 mM acetato amónico y D) 0,1% amoníaco

En cuanto a la distancia vertical del capilar a la fuente, se prueban distancias entre 3 y 10 mm, obteniéndose un máximo de respuesta a 5 mm para todos los compuestos, por lo que se selecciona como valor final. Dado que todos los compuestos siguen el mismo patrón, en la Figura 18 se presenta a modo de ejemplo la variación de la respuesta obtenida en el caso del BPA.

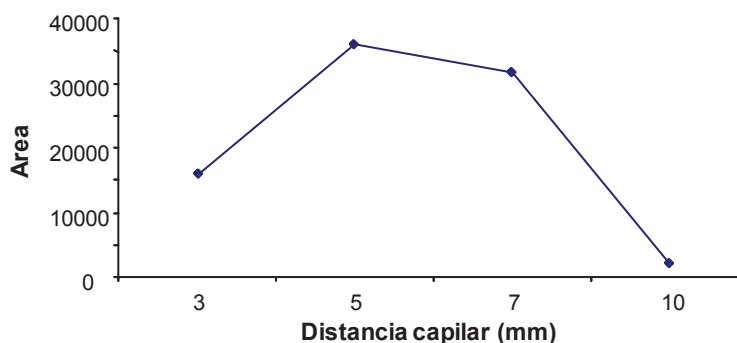


Figura 18. Respuesta obtenida para el BPA al variar la distancia del capilar a la fuente de ionización (mm)

2.3. Estudio de la separación cromatográfica

La separación cromatográfica se lleva a cabo en fase inversa, donde la fase estacionaria de la columna es una Hypersil Gold C₁₈ 150 x 2,1 mm (3 µm partícula) y la fase móvil una mezcla de agua y metanol, a la que se añade un 0,05% de amoníaco. Aunque se ha comprobado el uso del acetonitrilo como disolvente orgánico, se ha descartado debido a que los picos obtenidos presentaban asimetría.

Entre los factores que condicionan la separación cromatográfica destacan el gradiente de elución, el flujo de la fase móvil o la temperatura de la columna. En este caso la temperatura se fija a 40°C, pues una temperatura superior a la temperatura ambiente facilita el acondicionamiento/equilibrado de la columna, asegurando la reproducibilidad. El resto de parámetros se estudian de un modo univariante, considerando un volumen de inyección de 25 µL.

Los distintos gradientes de elución considerados se muestran en la Tabla 14. Los minutos previos al inicio del gradiente (marcados con signo negativo) son de equilibrado; es decir, durante este tiempo únicamente la fase móvil atraviesa la columna con el fin de acondicionarla para la elución. En este caso se necesitan 7 minutos para asegurar la reproducibilidad de los resultados.

Tabla 14. Gradientes estudiados para la elución de los analitos, donde t es el tiempo de elución (min), A es el porcentaje de agua Milli Q y B el de metanol, disolventes de la fase móvil

Gradiente 1			Gradiente 2			Gradiente 3			Gradiente 4		
t(min)	%A	%B	t(min)	%A	%B	t(min)	%A	%B	t(min)	%A	%B
-2	90	10	-2	70	30	-2	80	20	-7	80	20
0	90	10	0	70	30	0	80	20	0	80	20
1	5	95	1	70	30	1	80	20	1	80	20
4	5	95	5	0	100	5	0	100	5	0	100
10	90	10	15	0	100	20	0	100	12	0	100
11	90	10	17	70	30	22	80	20	14	80	20

En el primer gradiente fijado a modo de prueba (Gradiente 1), los compuestos no tienen tiempo suficiente para eluir. Por ello, en el Gradiente 2 se aumenta el tiempo de elución y el porcentaje inicial de metanol (un 20% más), llegando a los cinco minutos al 100% de este disolvente, lo que favorece la elución de los compuestos. Sin embargo, los picos obtenidos son asimétricos. Para solucionar este problema, el Gradiente 3 empieza con un porcentaje inicial de metanol intermedio, consiguiendo la elución de todos los compuestos con picos estrechos, simétricos y que están adecuadamente separados, como se muestran en la Figura 19. Dado que en el Gradiente 3 todos los compuestos eluyen antes de 15 minutos, el tiempo de análisis se reduce de 22 a 14 min en el Gradiente 4, que es el gradiente definitivo.

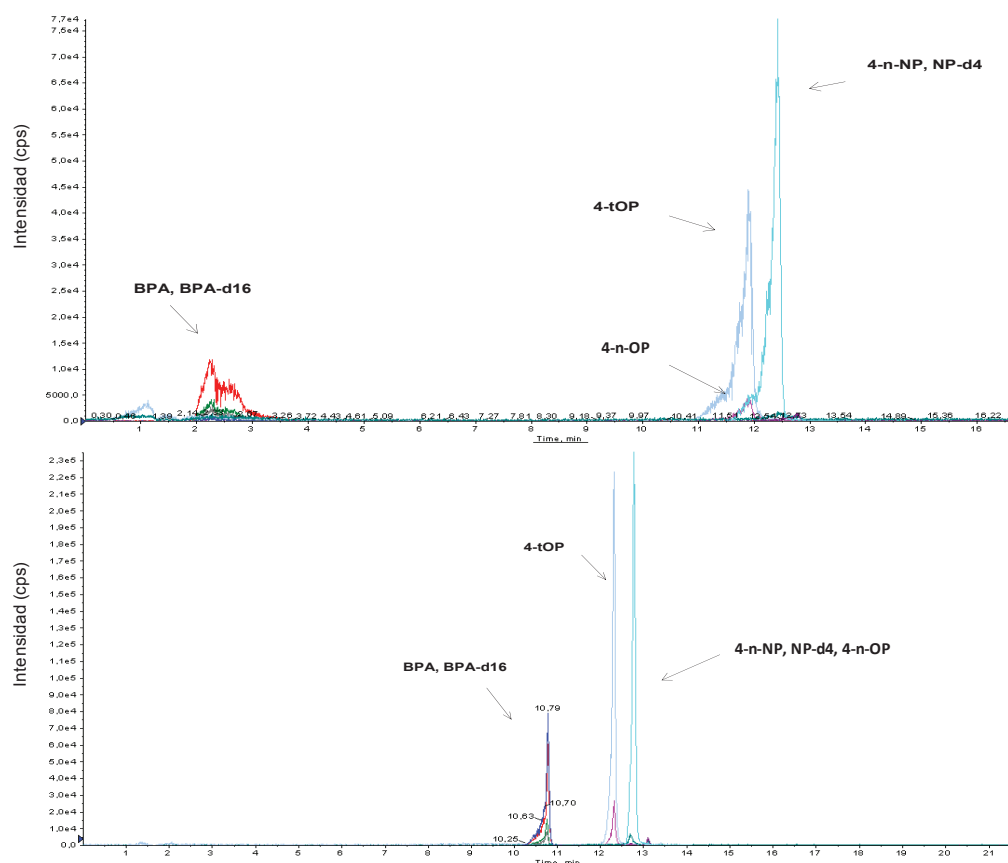


Figura 19. Cromatogramas TIC obtenidos al inyectar un patrón de una concentración de 100 µg/L con los gradientes 2 y 3 respectivamente

Seguidamente se evalúa el flujo de fase móvil (Figura 20), estudiando valores entre 0,2 a 0,3 mL/min [Boyd y cols., 2008]. Dado que se obtiene un máximo en 0,25 mL/min para todos los compuestos, este valor es el seleccionado.

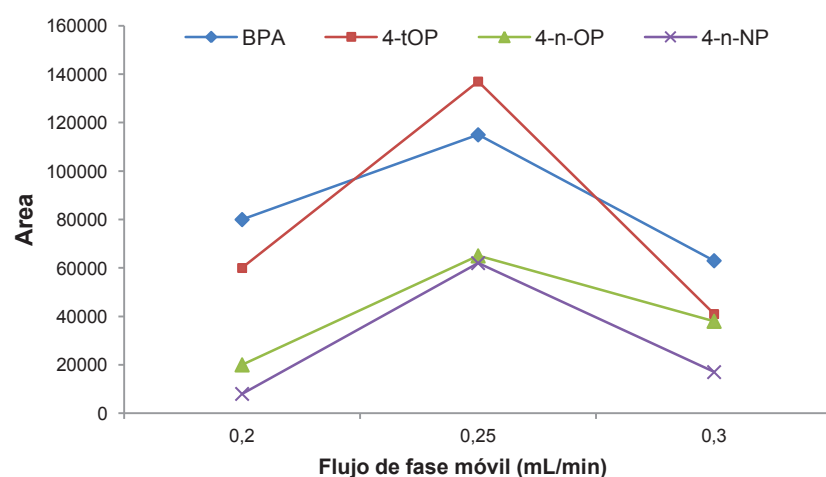


Figura 20. Influencia del flujo de fase móvil (mL/min) en la determinación cromatográfica

Como resumen, en la Tabla 15 se recogen las condiciones finales del método LC-MS/MS desarrollado para la determinación de APs y BPA. A continuación, en la Figura 21 se muestran los cromatogramas MRM de todos los compuestos bajo estudio, correspondientes a la transición de mayor intensidad obtenida con las condiciones comentadas hasta el momento. Como se puede observar, se consigue una buena separación cromatográfica en menos de 14 min.

Tabla 15. Condiciones finales del método LC-MS/MS desarrollado

MS/MS: Identificación y cuantificación de los compuestos					
Compuesto	t _R (min)	MRM ratio	Q1M	Q3M	CE (V)
BPA	9,40 ± 0,01	15,7 ± 2,8	227	212, 133	-24, -32
BPA-d ₁₆	9,39 ± 0,01	1,6 ± 0,1	241	142, 221	-44, -46
4-tOP	10,62 ± 0,02	8,9 ± 0,3	205	133, 116	-30, -76
NP	10,89 ± 0,02	5,8 ± 0,1	205	133, 116	-38, -74
4- <i>n</i> -OP	10,99 ± 0,01	-	219	106	-26
4- <i>n</i> -NP	11,23 ± 0,01	2,24 ± 0,2	219	106, 119	-28, -44
4- <i>n</i> -NP-d ₄	11,23 ± 0,01	14,4 ± 1,1	223	109, 129	-28, -46
Ionización ESI					
Parámetros fuente de ionización			Condición final		
Voltaje aplicado			-4.500 V		
Temperatura de la fuente			650°C		
Flujo de gas nebulizador 1 (N ₂)			35 psi		
Flujo de gas auxiliar (O ₂)			35 psi		
Flujo de gas cortina			10 psi		
Distancia vertical fuente-capilar			5 mm		
Separación cromatográfica					
Parámetros LC	Condición final	Gradiente de elución			
		t (min)	% H ₂ O	% MeOH	
Fase estacionaria	C18	-7	80	20	
Temperatura columna	40°C	0	80	20	
Fase móvil	Agua:Metanol	1	80	20	
Modificador	0,05% NH ₃ (en ambos disolventes)	5	0	100	
Flujo de fase móvil	0,25 mL/min	12	0	100	
Volumen de inyección	25 µL	14	80	20	
ESI, electrospray; CE, energía de colisión; Q1M, ion precursor; Q3M, iones producto; t _R , tiempo de retención					

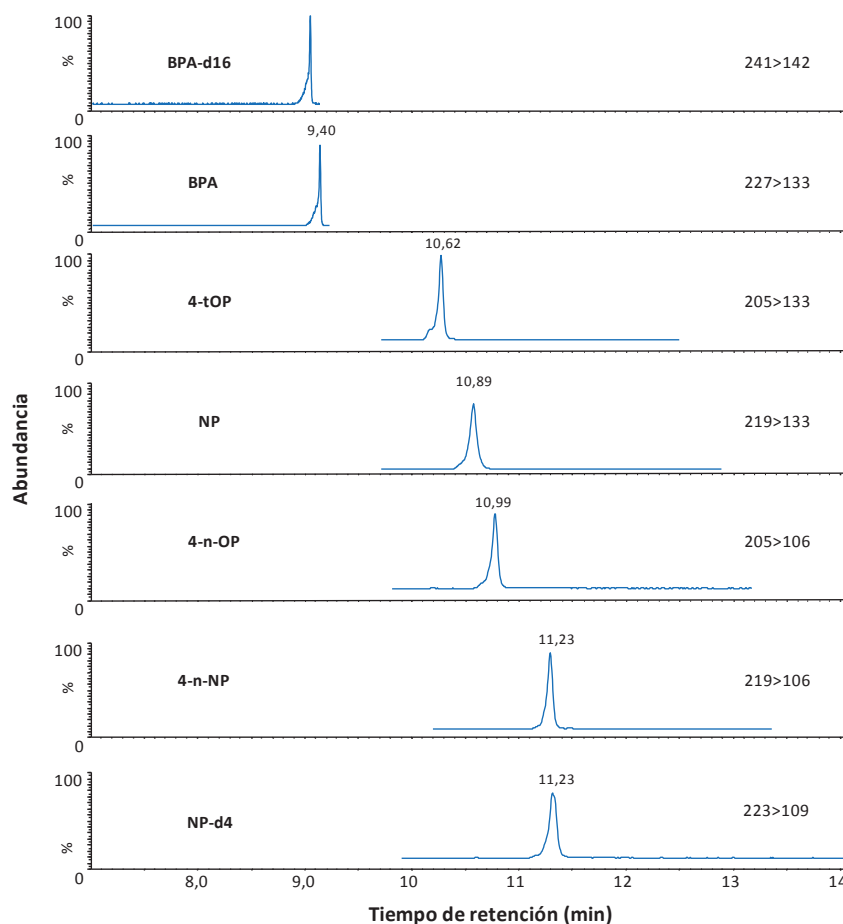


Figura 21. Cromatogramas MRM de los compuestos bajo estudio y sus análogos deuterados obtenidos en las condiciones LC-MS/MS seleccionadas

2.4. Estudio de blancos instrumentales

Como ya se ha mencionado en el Capítulo II (págs. 70-71), son muchos los factores que contribuyen a la presencia de blancos en el análisis de estos EDCs, como el uso de plásticos y detergentes, que deben evitarse a lo largo de todo el procedimiento experimental [Martínez *y cols.*, 2004]. En el caso de los APs se ha demostrado que el aire del laboratorio puede ser otra fuente de contaminación [Xie *y cols.*, 2006]. Los septum de los viales, los disolventes, los cartuchos de extracción en fase sólida o incluso los componentes del propio equipo de LC-MS, como los tubos y conexiones de plástico, pueden también causar este tipo de problemas [Loos *y cols.*, 2008]. En el caso del BPA, la principal fuente de contaminación se encuentra en los disolventes, concretamente en el agua ultrapura, debido a la migración del compuesto desde el sistema de purificación [Berkner *y cols.*, 2004; Choi *y cols.*, 2012].

Como solución a estos problemas algunos autores proponen el uso de una doble columna colocada antes del sistema de inyección [Niu *y cols.*, 2011]. De este modo se elimina la contaminación procedente del sistema cromatográfico, pues los picos correspondientes a los blancos se retrasan con respecto al de los analitos al quedar retenidos en la doble columna. Sin embargo, esta propuesta puede dar lugar a

pérdidas de sensibilidad, formación de picos asimétricos o problemas de sobrepresión y obstrucciones en la columna, que pueden dañar el equipo cromatográfico.

Teniendo en cuenta las desventajas y el coste adicional que supone esta alternativa, en esta memoria se realiza un amplio estudio del origen de los blancos en el método cromatográfico a fin de minimizarlo, evaluando la influencia de los septum de los viales, los disolventes de la fase móvil y los tubos y conducciones del equipo. Con el fin de conocer la contaminación de fondo de la que se parte, se inyecta un blanco de reactivo (25 μ L de metanol) en el sistema de LC-MS, utilizando como fase móvil agua Milli Q, que proviene de un sistema de purificación de agua ultrapura Milli-Q Gradiente A10/Elix (Millipore), y metanol de calidad HPLC. El cromatograma obtenido en esta inyección (Figura 22A) muestra únicamente picos de 4-tOP y NP, correspondientes a 2,2 ng y 26 ng, respectivamente.

Tras comprobar que la aportación de los blancos no proviene de los septum de PTFE/silicona, se realiza un “run en blanco” (blanco instrumental) que determina que la contaminación se origina en el propio sistema cromatográfico; por ello el siguiente paso es estudiar la influencia de los disolventes de la fase móvil. Dado que el sistema de purificación de agua puede ser una fuente de contaminación, ya que el agua es previamente almacenada en un reservorio de plástico (pudiendo dar lugar una migración de los compuestos desde las paredes del recipiente), se sustituye por otra obtenida directamente de un sistema Milli-Q Direct 5 (Millipore). Como se muestra en la Figura 22B, la señal obtenida al inyectar metanol (25 μ L) disminuye considerablemente, a valores de 0,15 ng de 4-tOP y 1,6 ng de NP. Finalmente, se comprueban los blancos obtenidos con disolventes de calidad LC-MS. Aunque no se encuentran variaciones al utilizar el agua LC-MS, si se observa una reducción significativa al sustituir el metanol de calidad HPLC por el metanol LC-MS. De hecho, no se observa pico en el caso del 4-tOP y la concentración de NP se reduce a 0,09 ng (Figura 22C).

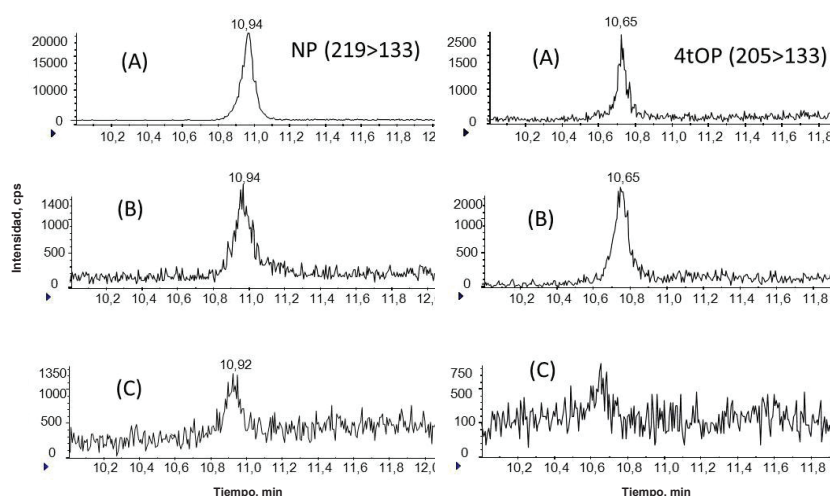


Figura 22. Cromatogramas obtenidos al inyectar un blanco de reactivo (25 μ L de metanol). (A) en las condiciones iniciales, (B) cuando se ha cambiado el sistema de purificación de agua MilliQ utilizada como fase móvil y (C) utilizando metanol calidad LC-MS como fase móvil

Finalmente se comprueba que los tubos y conexiones del sistema no son una fuente de contaminación en el caso de los compuestos bajo estudio, pues al sustituirlos por unos de PEEK no se observan variaciones en el blanco. Por tanto, el valor anteriormente comentado es el fijado para los blancos de NP, el cual será comprobado periódicamente a fin de mantenerlo bajo control.

2.5. Estudio de validación del método instrumental

En la Tabla 16 se muestran los resultados obtenidos al calcular los parámetros de calidad analítica del método instrumental, teniendo en cuenta la transición de mayor intensidad para cada compuesto, en términos de rango lineal, precisión (repetibilidad y precisión intermedia) y límites instrumentales.

Tabla 16. Rango lineal, factor de determinación (r^2), repetibilidad y precisión intermedia (calculadas a concentración de 50 $\mu\text{g/L}$), límite instrumental de detección (IDL) y límite instrumental de cuantificación (IQL) de los compuestos bajo estudio

Compuesto	Rango lineal ($\mu\text{g/L}$)	r^2	Repetibilidad DER% (n=10)	Precisión intermedia DER% (n=10)	IDL (ng)	IQL (ng)
BPA	IQL-1000	0,9999	0,82	2,7	1,5	1,8
4-tOP	IQL-1000	0,9998	5,7	8,5	1,4	2,7
4-n-OP	IQL-1000	0,9993	3,6	5,8	0,3	0,7
4-n-NP	IQL-1500	0,9996	3,1	6,1	0,4	0,6
NP	IQL-1500	0,9991	7,2	8,6	1,1	2,2

El rango lineal es del orden de 10^3 para todos los compuestos, alcanzándose 1000 $\mu\text{g/L}$ en el caso del BPA, el 4-tOP y el 4-n-OP y los 1500 $\mu\text{g/L}$ para el 4-n-NP y el NP. Los factores de determinación son superiores a 0,9991 en todos los casos, lo que confirma la linealidad en la respuesta de las concentraciones estudiadas. Las desviaciones estándar relativas (DER%) varían entre 1-9%, por lo que tanto la repetibilidad como la precisión intermedia se consideran satisfactorias. Por último, la minimización de los problemas de blancos permite alcanzar límites instrumentales de cuantificación (IQL) menores a 3 ng en todos los casos.

3. ASPECTOS DE INTERÉS EN EL PRE- Y EL TRATAMIENTO DE MUESTRA

Antes de empezar con el desarrollo de los métodos para el análisis de aguas cabe hacer referencia a ciertos aspectos relacionados con el pretratamiento de muestra, así como con el propio tratamiento. Estas etapas pueden pasar desapercibidas durante la puesta a punto de un método, sin embargo pueden llegar a ser decisivas cuando éste se aplica a muestras reales. En este apartado se recogen los estudios detallados llevados a cabo relacionados con la limpieza del material (determinante para este tipo de compuestos debido a los problemas de contaminación de blancos ya comentados y a los bajos niveles exigidos), el almacenamiento de muestra (tanto el tiempo máximo como las condiciones), la filtración de muestras acuosas y la filtración de extractos orgánicos previa a su inyección en el sistema cromatográfico. Los análisis de las aguas correspondientes a todos estos ensayos se llevan a cabo empleando la metodología basada en una DLLME-LC-MS/MS, que será desarrollada en el apartado 4.1 de este Capítulo (págs. 111-116).

3.1. Limpieza del material

Ya se ha comentado la necesidad de evitar el uso del material de plástico y detergentes durante todo el procedimiento experimental; surge entonces la duda de cómo lavar el material de vidrio que se va a emplear. Aunque en la bibliografía se muestran distintos procedimientos de limpieza, basados en lavados con disolventes [Schmitz-Afonso *y cols.*, 2003] o con jabón alcalino [Fiamegos *y cols.*, 2007], calcinación en mufla durante 2-8 horas [Brix *y cols.*, 2010; Martínez *y cols.*, 2004; Xie *y cols.*, 2006], etc. no parece haber un consenso claro sobre cuál es el más acertado.

Por ello, se pretende establecer un protocolo de limpieza sencillo y eficaz, evaluando tres alternativas: (a) calcinación en mufla (24h a 350°C) seguido de un enjuague con metanol antes del uso; (b) lavado con acetona QP, 4 ó 5 lavados de agua Milli Q, secado y enjuague con metanol antes del uso y (c) lavado con acetona QP, baño de agua con jabón alcalino al 5% (LA 13) durante al menos 24 horas y lavado del apartado b (agua de grifo, agua Milli Q y metanol).

Los resultados del ensayo demuestran diferencias entre BPA y APs (Figura 23). Para el BPA, el valor más elevado de blanco se obtiene con el protocolo (c), por lo que se descarta; aunque la señal es menor al aplicar el protocolo (a), este procedimiento no ofrece buenos resultados para los APs. Por estos motivos, y dado que ofrece resultados satisfactorios para todos los compuestos y requiere menor tiempo, se escoge como protocolo de limpieza el (b) basado en un lavado con disolventes.

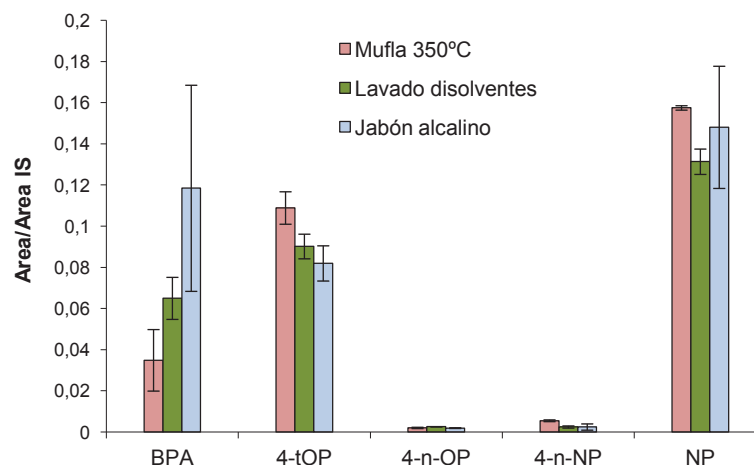


Figura 23. Resultados obtenidos con los distintos protocolos de limpieza (n=3)

3.2. Almacenamiento de muestra: estudio de estabilidad

La muestra debe mantener sus propiedades iniciales hasta el análisis por lo que debe ser conservada adecuadamente, evitando procesos de degradación y/o adsorción al recipiente utilizado. Generalmente, las muestras de agua se almacenan en nevera a 4°C antes del análisis; sin embargo, el tiempo máximo de almacenamiento varía en función de los estudios encontrados en la bibliografía, de 24 horas [Céspedes *y cols.*, 2008; Luo *y cols.*, 2010; Schmitz-Afonso *y cols.*, 2003] hasta una semana [Liu *y cols.*, 2003].

Dado que la diferencia entre los tiempos de almacenamiento antes mencionados es elevada, se realiza un estudio de estabilidad (de 0 a 7 días) para evaluar la posible degradación de los APs y BPA en agua de mar. Si bien el ensayo se lleva a cabo con agua de mar, el resultado obtenido puede servir de orientación para evaluar el tiempo máximo para otro tipo de aguas, en el caso de que no se realice un estudio particular.

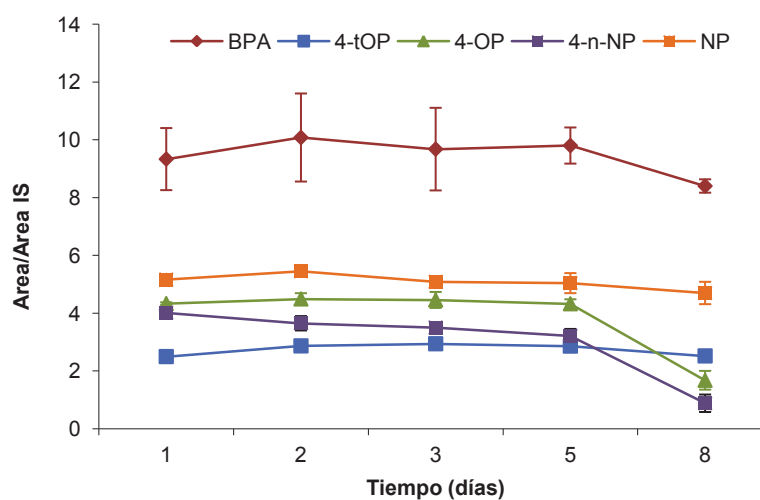


Figura 24. Estudio del tiempo de almacenamiento de muestras de agua a 4°C y sin ningún modificador añadido (n=2)

Como se muestra en la Figura 24, la señal se mantiene constante para todos los compuestos hasta el quinto día. Sin embargo, se observa un descenso brusco ($\sim 30\%$) a partir de este día en el caso de los isómeros lineales (4-*n*-OP y 4-*n*-NP) y el BPA.

Para comprobar si el descenso de señal de los 4-*n*-alquilfenoles y el BPA es debido a la adsorción a las paredes del recipiente, se evalúa si la adición de un modificador permite almacenar durante más tiempo la muestra, repitiendo el ensayo anterior por duplicado ($n=2$) añadiendo al agua de mar dos porcentajes distintos de metanol (1 y 5%). A modo de ejemplo, en la Figura 25 se presentan los resultados obtenidos en el análisis del 4-*n*-NP. La adición de un 5% de metanol reduce la adsorción de los compuestos a partir del quinto día, manteniendo la señal constante hasta 3 días más (tiempo máximo de almacenamiento estudiado en este ensayo). Sin embargo, la presencia de este disolvente (aún en pequeñas cantidades) puede afectar a la eficiencia de la extracción, pues puede modificar la partición analito-extractante o influir en la reproducibilidad de los resultados (como ocurre en la DLLME, técnica de extracción utilizada en este estudio). Por tanto, se recomienda analizar las muestras antes del quinto día desde su recogida. De no ser posible, se debe considerar la adición de metanol en la muestra (5%), tras comprobar que el modificador no afecta a la técnica de extracción utilizada.

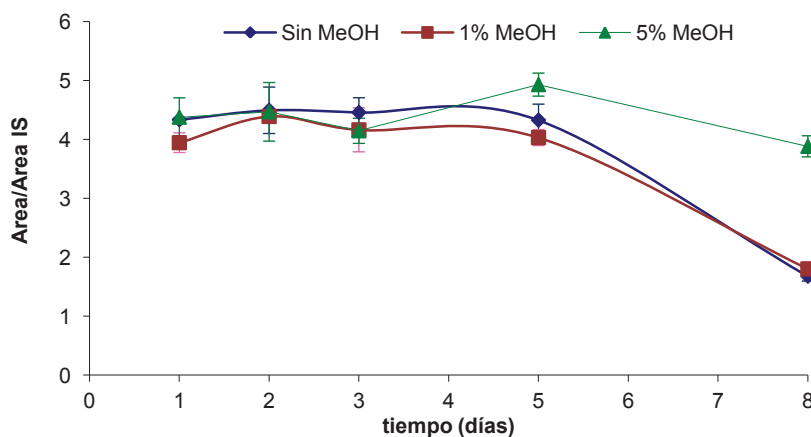


Figura 25. Influencia de la adición de MeOH en el análisis del 4-*n*-NP ($n=2$)

3.3. Filtración de la muestra acuosa

Es muy común realizar una etapa de filtración de muestras antes de su tratamiento, pues permite la eliminación de partículas sólidas que puedan interferir en el análisis cromatográfico. En el caso de los compuestos bajo estudio se han utilizado filtros de fibra de vidrio [Beck *y cols.*, 2005; Liu *y cols.*, 2010; Richter *y cols.*, 2009; Schmitz-Afonso *y cols.*, 2003], de membrana [Liu *y cols.*, 2010; Luo *y cols.*, 2010; Petrovic *y cols.*, 2001], de celulosa [López-Darias *y cols.*, 2010] y de nylon [Brix *y cols.*, 2010]; sin embargo, no siempre se han obtenido buenos resultados debido a una pérdida considerable de analitos (retención en los filtros).

Para evaluar esta retención, así como la contribución de la etapa de filtración a los blancos de procedimiento, se llevan a cabo dos ensayos en los que se consideran los filtros de fibra de vidrio 0,6 μm MN GF-6, filtros de celulosa 0,45 μm y filtros de nylon GNWP 0,2 μm . El primer ensayo (Figura 26A) se realiza comparando muestras sin sobrecargar sin filtrar y filtradas a través de los tres tipos de filtros ensayados, de manera que se pueda estimar la contribución de cada uno de ellos. Mientras que la señal de blanco más elevada para todos los compuestos se observa con el filtro de celulosa (especialmente en el caso del 4-tOP), los filtros de nylon son los que proporcionan menor señal, por lo que en principio son los seleccionados.

Si ahora se comparan los resultados obtenidos sobrecargando la muestra antes (AF) y después (DF) de la filtración, se puede comprobar qué porcentaje de analitos se retiene en el filtro. Como se aprecia en la Figura 26B, los filtros de nylon retienen todos los analitos (>95%), mientras los de celulosa retienen fuertemente el 4-*n*-NP (72%) y 4-tOP (60%). En el caso de los filtros de fibra de vidrio los compuestos también se retienen, pero en menor medida (~40%).

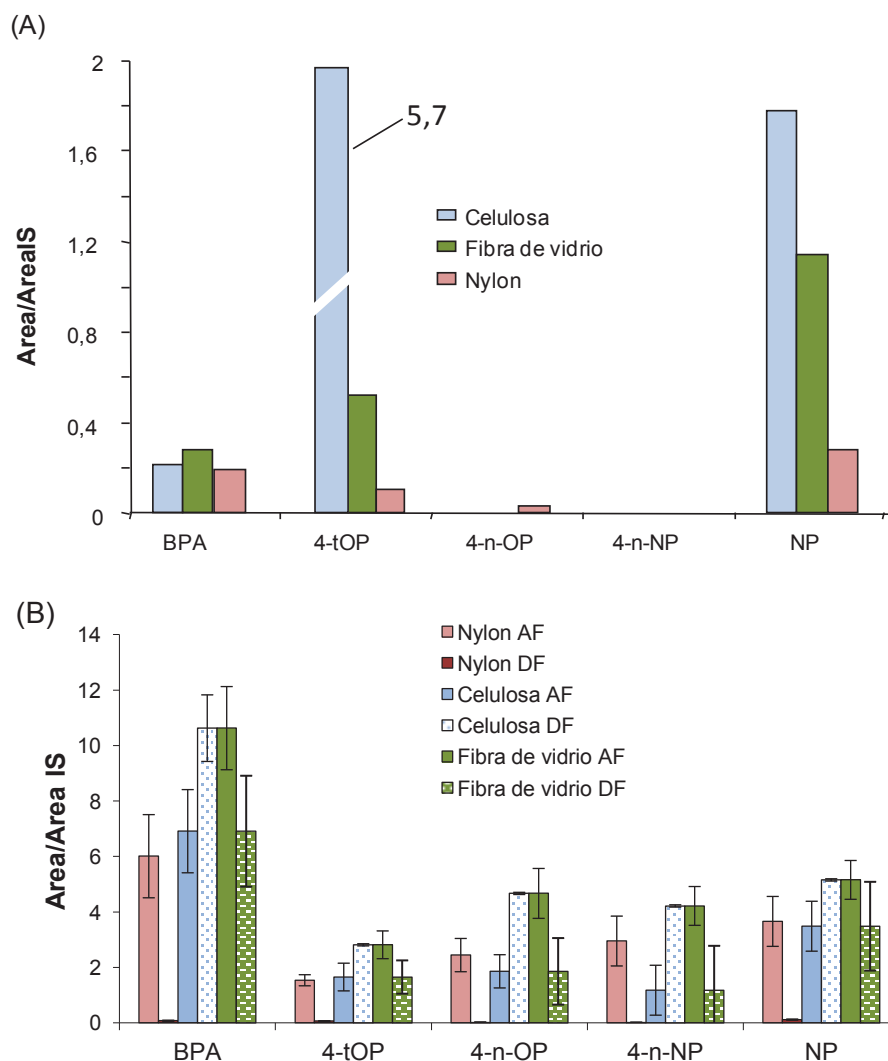


Figura 26. Estudio de la etapa de filtración de muestra: (A) contaminación de blancos y (B) adsorción de los compuestos a diferentes filtros ($n=2$), donde AF y DF indican que la sobrecarga de los compuestos se realizan antes y después de la filtración, respectivamente

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos no se recomienda la filtración de las muestras de agua de mar. En el caso de muestras que presentan gran cantidad de partículas en suspensión, será conveniente buscar otras alternativas como la centrifugación y, en caso de que se considere que la filtración es necesaria, se usarán los filtros de fibra de vidrio.

3.4. Filtración del extracto final

Para evitar que las pequeñas partículas presentes en los extractos orgánicos dañen la columna y el sistema cromatográfico se lleva a cabo una filtración con filtros de jeringa, siendo los más comunes en la bibliografía los de polipropileno (GHP, 0,45 μm) [Yiantzi *y cols.*, 2010] y los de fluoruro de polivinilideno (PVDF, 0,2 μm) [Schmitz-Afonso *y cols.*, 2003].

En este caso se estudian los filtros de jeringa de 0,2 μm nylon, 0,2 μm PTFE y 0,45 μm de fluoruro de polivinilideno (PVDF). De nuevo se evalúan tanto los problemas de contaminación de blancos asociados a los filtros (cesión de analitos) como las pérdidas de analito durante la filtración de los extractos (retención de analito en el filtro). Como se puede observar en la Figura 27A, con los filtros de nylon se obtiene una señal elevada del blanco con respecto a la muestra sin filtrar, especialmente en el caso del NP, por lo que este tipo de filtro se descarta. Entre los filtros de PDVF y PTFE se escogen los segundos, pues presentan menor variabilidad en los resultados (Figura 27B). Los extractos orgánicos correspondientes a las muestras analizadas aplicando los distintos métodos analíticos desarrollados a lo largo de esta memoria (independientemente de la matriz) se filtran a través de un filtro de PTFE de 0,2 μm previamente a su determinación, aunque no se mencione explícitamente en el texto.

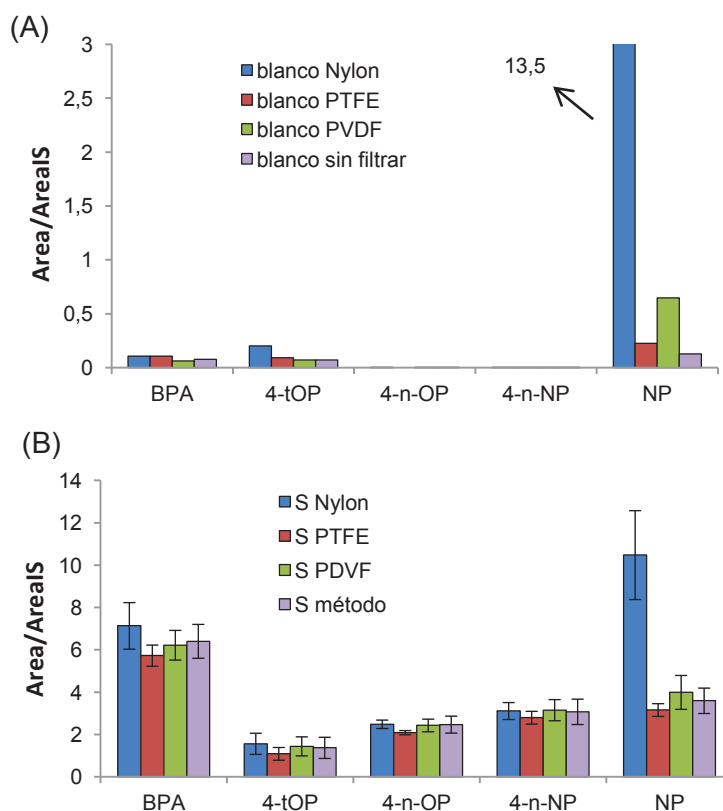


Figura 27. Estudio de la etapa de filtración del extracto final previa a la inyección cromatográfica: (A) contaminación de blancos y (B) adsorción de compuestos a los filtros (n=2)

4. DESARROLLO DE UN MÉTODO DE MICROEXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA (DLLME) Y DETERMINACIÓN POR LC-MS/MS PARA ANÁLISIS DE APS Y BPA EN AGUA

El método desarrollado en este apartado consta de tres etapas principales: una microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME), una centrifugación que permita la separación de los disolventes inmiscibles (3500 rpm durante 3 min) y la determinación por LC-MS/MS, ya explicada en el apartado 1 de este Capítulo (págs. 95-105). En las próximas líneas se hace referencia al desarrollo de la etapa de DLLME, que es la etapa crítica del procedimiento.

4.1. Estudio de las variables de la DLLME

Teniendo en cuenta las variables que influyen en la DLLME, se optimizan de un modo univariante el disolvente de extracción, su volumen y el tiempo de extracción. Todos los ensayos han sido llevados a cabo con muestras de agua de mar previamente filtradas (a través de filtro de 1 mm).

Para el estudio del disolvente de extracción se seleccionan seis disolventes orgánicos: acetato de etilo, hexano, ciclohexano, diclorometano (DCM), 1,2-dicloroetano (DCE) y 1-octanol, cuyas densidades varían entre 0,6-1,3 g/mL y sus solubilidades en agua entre 0 y 8,7 (%).

El acetato de etilo, se descarta tras comprobar que las dos fases no se separan, pues a pequeños volúmenes este disolvente es miscible con el agua. Los resultados obtenidos para los otros cinco disolventes se muestran en la Figura 28. Las recuperaciones mostradas con el DCM y el DCE no superan el 10%, lo que puede ser en parte debido a la dificultad del procedimiento de recogida de la fase orgánica, pues la gota de disolvente se sitúa en la parte inferior del tubo. Con el hexano y el ciclohexano se obtienen recuperaciones en torno al 30% para la mayoría de los APs (excepto el NP, que presenta una recuperación de aprox. 100% con el hexano y nula con el ciclohexano). Sin embargo, ninguno de los dos disolventes permite extraer el BPA, lo que se explica teniendo en cuenta la polaridad del compuesto. Dado que el 1-octanol sí que permite la extracción de todos los compuestos con buenas recuperaciones (superiores al 90%), se selecciona como disolvente de extracción.

En el caso de los APs, las recuperaciones obtenidas superan el 100%, alcanzando el 160% en el caso del 4-tOP. Estos resultados sugieren una posible influencia del disolvente de extracción en la ionización de los compuestos durante el análisis instrumental. Tras comprobar que la presencia de 1-octanol en un patrón aumenta la señal obtenida con respecto a la de un patrón sin 1-octanol, el disolvente de extracción se añadirá al calibrado utilizado para la cuantificación de los compuestos.

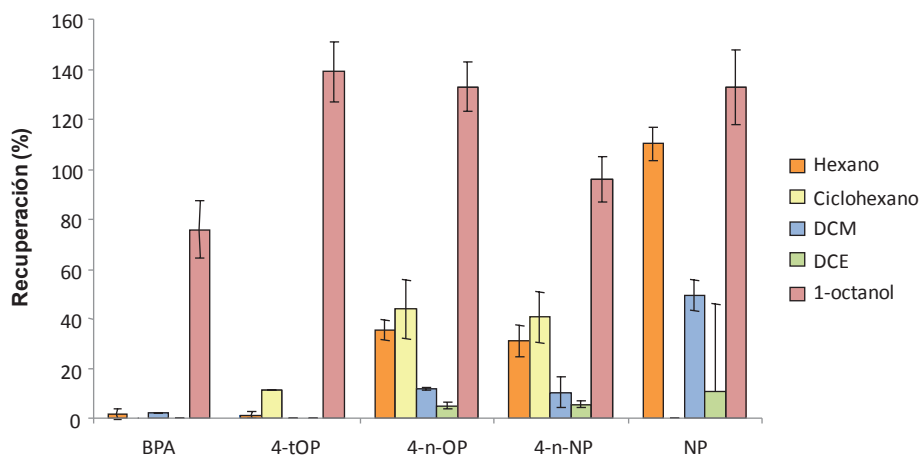


Figura 28. Estudio del disolvente de extracción (n=3)

En cuanto al volumen de disolvente utilizado (Figura 29) y el tiempo de extracción (Figura 30), los resultados obtenidos son similares para todos los compuestos. En el primer caso, y considerando que se trata de un método de microextracción [Yiantzi y cols., 2010], se estudian valores de 50, 100, 200 y 300 μ L de 1-octanol; se selecciona un volumen de 100 μ L por presentar un máximo de señal para todos los EDCs estudiados. Para el ensayo del tiempo de extracción, se prueban 3, 5 y

7 minutos. A medida que aumenta el tiempo de extracción aumenta la señal obtenida para cada compuesto, llegando a un máximo a los 5 minutos y manteniéndose a tiempos mayores. Con el fin de minimizar el tiempo de análisis del método, se fijan 5 min como tiempo de extracción.

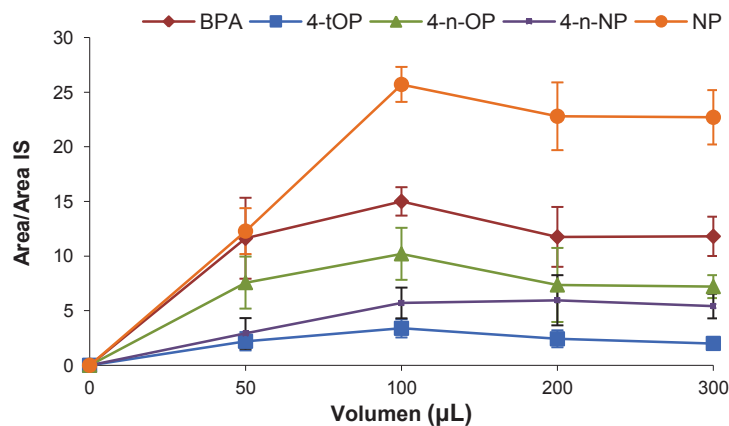


Figura 29. Selección de volumen del disolvente de extracción (n=3)

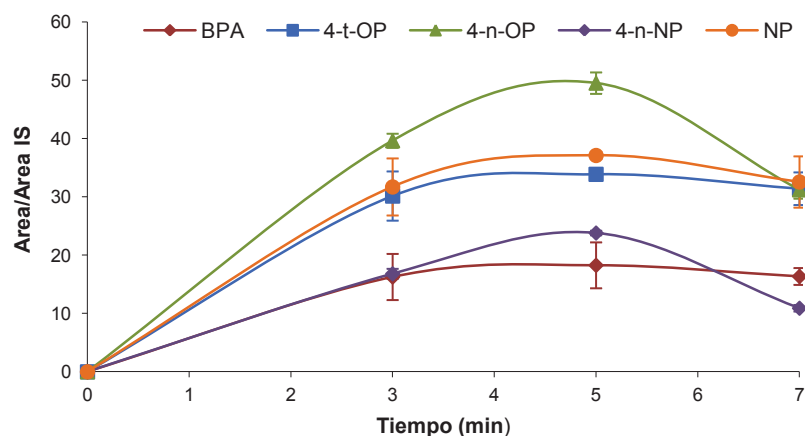


Figura 30. Estudio del tiempo de extracción (n=3)

4.2. Estudio del efecto matriz

Para evaluar la existencia de efecto matriz se comparan las pendientes de las rectas obtenidas al realizar un calibrado con patrones internos y una recta de adiciones estándar mediante un test *t*-Student ($P=95\%$). En la Tabla 17 se muestra el valor de la pendiente de cada recta junto a su error, así como los resultados obtenidos al aplicar dicho test. Además, a modo de ejemplo, en la Figura 30 se presentan las representaciones gráficas correspondientes al 4-tOP y el NP.

Tabla 17. Aplicación del test-t Student para determinar la existencia del efecto matriz, donde b=pendiente, Sb=desviación estándar de la pendiente, r²=coeficiente de determinación y gdl=grados de libertad

Compuesto	Calibrado			Adición			t _{tab} (gdl)	t _{exp}	Efecto matriz
	b	Sb	r ²	b	Sb	r ²			
BPA	0,3567	0,0060	0,9988	0,2517	0,0058	0,9973	2,20(11)	12,5	SI
4-tOP	0,0781	0,0018	0,9983	0,0777	0,0015	0,9988	2,31(8)	0,165	NO
4-n-OP	0,2006	0,0038	0,9988	0,1891	0,0037	0,9984	2,20(11)	2,12	NO
4-n-NP	0,1529	0,0015	0,9995	0,1148	0,0025	0,9980	2,20(11)	12,71	SI
NP	0,2229	0,0132	0,9958	0,1626	0,0022	0,9999	12,36(7)	4,47	SI

Como se puede observar, los componentes de la matriz influyen negativamente en el caso del BPA, el 4-n-NP y el NP, lo que provoca la supresión de la señal durante la ionización. Por su parte, el 4-tOP y el 4-n-OP no presentan efecto matriz. Para compensar la supresión de señal se utilizan patrones internos subrogados, añadidos a la muestra antes del procedimiento experimental, cuantificando los compuestos mediante el cálculo de factores de respuesta relativos (RRF).

4.3. Estudio de validación de método

Las condiciones del método de DLLME-LC-MS/MS desarrollado se resumen a continuación: 30 mL de agua de mar se extraen con 100 µL de 1-octanol agitando durante 5 minutos a 1200 rpm. Tras la extracción, se lleva a cabo una centrifugación durante 3 min a 3500 rpm y se recoge la gota de extractante, redisolviéndola en 1 mL de metanol. Los extractos se filtran utilizando un filtro de jeringa de PTFE de 0,2 micras. Las características del método instrumental se recogen en la pág. 102 de este Capítulo.

La validación del método se lleva a cabo con muestras sobrecargadas, de acuerdo con la Decisión de la Comisión 2002/657/EC [Decisión-2002/657]. El estudio engloba el rango lineal, la exactitud, la precisión, los límites de detección y cuantificación de método y la estimación de la incertidumbre.

Para establecer el rango lineal del método se realiza un calibrado de siete puntos (n=2) en el rango de concentraciones de 0,09 a 50 µg/L. La respuesta ha sido lineal desde el MQL a 20 µg/L, con coeficientes de determinación (r²) superiores a 0,9989. La exactitud y precisión del método para cada compuesto se determina a tres niveles de concentración diferentes, teniendo en cuenta el rango lineal: bajo (0,09 µg/L), medio (5 µg/L) y alto (20 µg/L).

Tabla 18. Exactitud (recuperaciones analíticas, R%), desviaciones estándar relativa (DER%) para la repetibilidad (n=7) y precisión intermedia (n=10) e incertidumbre expandida relativa (U_{exp} %) obtenidas con el método analítico a tres niveles de concentración diferentes en muestra

Concentración (µg/L)	Compuesto	Exactitud (R%)	Repetibilidad (DER%)	Precisión intermedia (DER%)	U_{exp} (%) $k=2$ (95%)
0,09	BPA	96	8	8	21
	4-tOP	95	6	9	21
	4-n-OP	104	9	9	20
	4-n-NP	95	5	6	21
	NP	94	10	10	21
5	BPA	89	5	5	20
	4-tOP	80	6	6	23
	4-n-OP	88	4	7	21
	4-n-NP	82	5	5	20
	NP	87	5	6	20
20	BPA	97	6	8	20
	4-tOP	88	4	7	20
	4-n-OP	85	3	3	22
	4-n-NP	91	4	4	21
	NP	86	3	3	20

Los resultados obtenidos (Tabla 18) se consideran muy satisfactorios, pues las recuperaciones varían entre 84 y 104%, con una DER inferior al 10%. Esto confirma que el método analítico es reproducible y exacto en el rango de 0,09-20 µg/L para los compuestos bajo estudio. La incertidumbre expandida relativa (%), calculada según el criterio descrito en la guía EURACHEM/CITAC [Ellison *y cols.*, 2000] es aceptable (menor del 23%) en todos los casos, para $k=2$ en un intervalo de confianza del 95%.

Para el cálculo teórico de los límites de detección y cuantificación se toma de referencia la señal de blancos de muestra (n=7); es decir, agua de mar que no contiene o presenta una concentración muy baja de los compuestos bajo estudio. Además de estimar teóricamente estos límites, se ha realizado una verificación experimental de los límites de cuantificación, sobrecargando las muestras a una concentración próxima al MQL teórico en cada caso. Las recuperaciones analíticas (n=5) obtenidas varían del 90 a 110% y las DER% son menores al 20%, con lo que se demuestra la validez de dichos límites. En la Tabla 19 se muestran los límites calculados teóricamente, los experimentales y las normas de calidad ambiental (EQS) establecidas en la Directiva 2013/39/UE. Los MQL del método permiten la determinación de los compuestos a niveles inferiores a los establecidos por la Directiva con una exactitud y precisión satisfactorias. Además, en el caso del 4-n-NP, el MQL obtenido es menor que 30% del valor de la norma de calidad ambiental, de acuerdo con la Directiva 2009/90/CE [Directiva-2009/90].

Tabla 19. Límites de detección y cuantificación (teóricos y experimentales) del método, desviaciones estándar relativa (DER%) y recuperaciones (R%) obtenidas. Normas de calidad ambiental (EQS) recogidas en la Directiva 2013/39/UE: media anual (AA) y concentración máxima admisible (MAC)

Compuesto	Límites teóricos		Límites experimentales			EQS Directiva 2013/39/UE	
	MDL($\mu\text{g/L}$)	MQL($\mu\text{g/L}$)	MQL($\mu\text{g/L}$)	DER%	R%	AA($\mu\text{g/L}$)	MAC($\mu\text{g/L}$)
BPA	0,006	0,020	0,020	9	100	-	-
4-tOP	0,003	0,007	0,008	19	108	0,01	No aplicable
4-n-OP	0,003	0,006	0,006	10	95	0,01	No aplicable
4-n-NP	0,001	0,003	0,005	15	90	0,3	2
NP	0,010	0,029	0,030	9	104	0,3	2

4.4. Aplicación a muestras

Se han analizado cuatro muestras de agua de mar recogidas en distintos puntos de la costa de A Coruña, considerando tanto zonas industriales como urbanas. La presencia de los isómeros lineales (4-n-OP y 4-n-NP) y del BPA sólo se ha evidenciado en una muestra de zona industrial, a concentraciones menores 0,07 $\mu\text{g/L}$. En este mismo punto se ha obtenido una concentración de 4-tOP de 0,11 $\mu\text{g/L}$, valor que supera los EQS establecidos en la Directiva 2013/39/UE para este compuesto (0,01 $\mu\text{g/L}$). Por su parte, el NP se ha medido en dos muestras de zonas industriales (0,07 y 0,14 $\mu\text{g/L}$) a concentraciones inferiores a las fijadas en esta Directiva (EQS = 0,3 y 2 $\mu\text{g/L}$). En la Figura 31 se pueden ver los cromatogramas MRM pertenecientes a la muestra, en la que se han determinado todos los EDCs bajo estudio. Este punto de muestreo está situado próximo a una estación depuradora de aguas residuales (EDAR), donde estos compuestos se generan o no se eliminan en su totalidad.

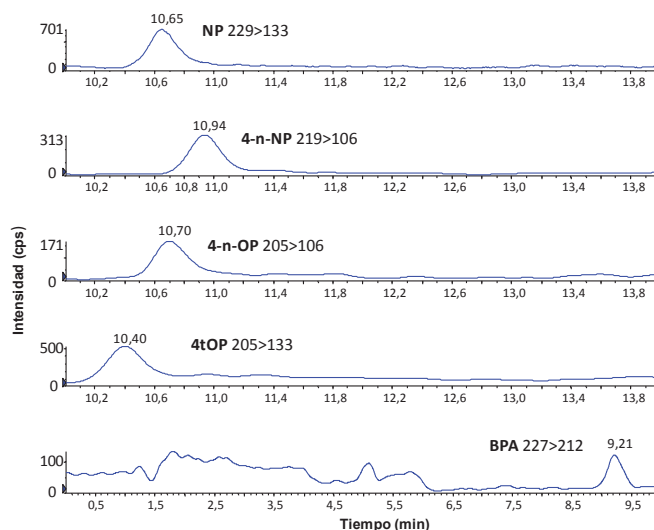


Figura 31. Cromatogramas MRM de una muestra de agua de mar analizada con el método DLLME-LC-MS/MS propuesto

Por otra parte, se ha comprobado la aplicabilidad del método a otro tipo de aguas: superficiales y de abastecimiento. Se han analizado cinco muestras de cada tipo, recogidas en diferentes zonas del área metropolitana de A Coruña, obteniéndose recuperaciones de 95 a 104% en el caso de aguas superficiales y de 98-105% en aguas de abastecimiento; en ambos casos la DER es menor al 10% lo que demuestra la buena precisión del método. Estos valores corroboran que los patrones subrogados suprimen el efecto matriz, haciendo que el método sea aplicable a otro tipo de aguas; sin embargo, sería necesario realizar más ensayos a fin de validar dicho método en cada una de las matrices.

5. DESARROLLO DE UN MÉTODO DE EXTRACCIÓN CON DISOLVENTE MINIATURIZADA ASISTIDA POR MEMBRANAS (MASE) Y DETERMINACIÓN POR LC-MS/MS PARA EL ANÁLISIS DE APS EN AGUA

La metodología propuesta en este apartado consta de las siguientes etapas principales: una extracción con disolvente miniaturizada asistida por membranas (MASE) y la determinación mediante LC-MS/MS. La etapa de extracción es la condicionante de la metodología y por ello es la que se discute a continuación. Debido a la incompatibilidad del disolvente de extracción con la fase móvil de LC, se evapora el extracto en corriente de nitrógeno y se redissuelve en 0,2 mL de metanol para la inyección. El método instrumental LC-MS/MS es el descrito en el apartado 1 de este Capítulo (págs. 95-105).

5.1. Acondicionamiento de membranas

Las membranas deben ser acondicionadas antes de cada uso con el fin de eliminar interferentes que influyen negativamente en la extracción y determinación, como pueden ser ftalatos y alcanos [Moeder *y cols.*, 2012]. En este caso se acondicionan con el disolvente de extracción, agitando a 75 rpm a temperatura ambiente durante 2 horas. Pasado este tiempo, el disolvente se cambia y el proceso se repite, dejando las membranas sumergidas en el disolvente durante toda la noche sin agitación.

5.2. Estudio de las variables de MASE para agua mar

Para el desarrollo de la metodología se ha utilizado agua de mar previamente filtrada (filtro de 1 mm). Se han optimizado de un modo univariante el disolvente de extracción, la temperatura y el tiempo de extracción. Aunque existen otras variables que pueden influir en las técnicas de equilibrio, como el pH, la velocidad de agitación o el efecto salino, no se han estudiado en este caso pues parecen no ser críticos en el análisis de estos compuestos [Hauser *y cols.*, 2001].

En primer lugar se lleva a cabo el estudio del disolvente de extracción, en el que se consideran tres disolventes (volumen inicial de 500 μL): acetato de etilo, diclorometano y hexano. El resto de parámetros se fijan teniendo en cuenta estudios previos encontrados en la bibliografía [Schellin *y cols.*, 2003], de la siguiente manera: tiempo de extracción, 40 min; temperatura, 40°C; velocidad de extracción, 750 rpm. Los resultados obtenidos para cada disolvente se muestran en la Figura 32.

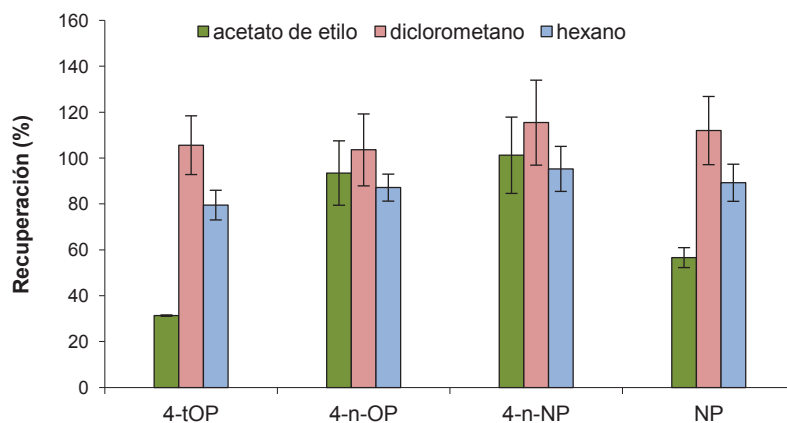


Figura 32. Estudio del disolvente de extracción de MASE (n=3)

Las recuperaciones obtenidas cuando el acetato de etilo se utiliza como disolvente de extracción son bajas (<40%) en el caso de los isómeros ramificados (4-tOP y NP). Tanto el DCM como el hexano proporcionan buenos resultados; sin embargo, la DER% en el caso del DCM es mayor del 20% para todos los compuestos. Por estos motivos se selecciona el hexano como disolvente de extracción.

La temperatura es otro de los parámetros que influye en la extracción (Figura 33). El ensayo se lleva a cabo a temperatura ambiente ($\sim 20^\circ\text{C}$) y a 40°C . Mientras que la temperatura no influye en el caso de los isómeros lineales (4-n-OP y 4-n-NP), sí se observa variación para los isómeros ramificados (4-tOP y NP), para los que se obtienen mejores resultados a menor temperatura. A la vista de estos datos se decide no probar temperaturas superiores a 40°C y la extracción se lleva a cabo a temperatura ambiente, simplificando así el proceso de extracción.

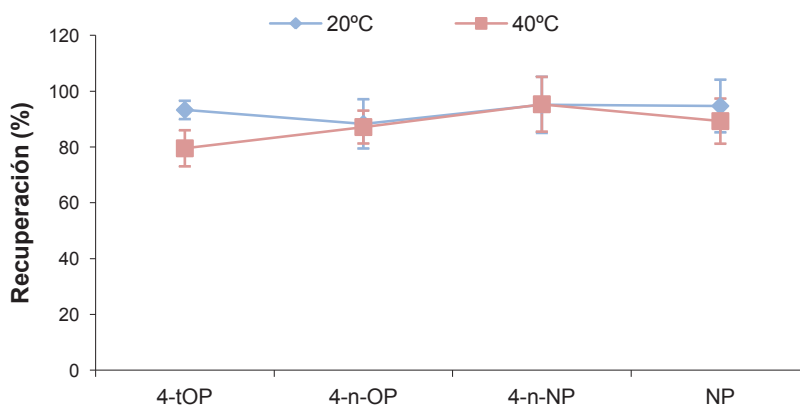


Figura 33. Estudio de la temperatura de extracción en MASE (n=3)

Por último se estudia el tiempo de extracción. Teniendo en cuenta trabajos previos de MASE para el análisis de otros compuestos, se seleccionan tiempos de extracción comprendidos entre 40 y 120 minutos [Moeder *y cols.*, 2012; Schellin *y cols.*, 2006]. Como se puede ver en la Figura 34, el equilibrio se alcanza a 60 min para la mayoría de los compuestos, por lo que se selecciona este valor como tiempo de extracción a fin de reducir el tiempo total de análisis.

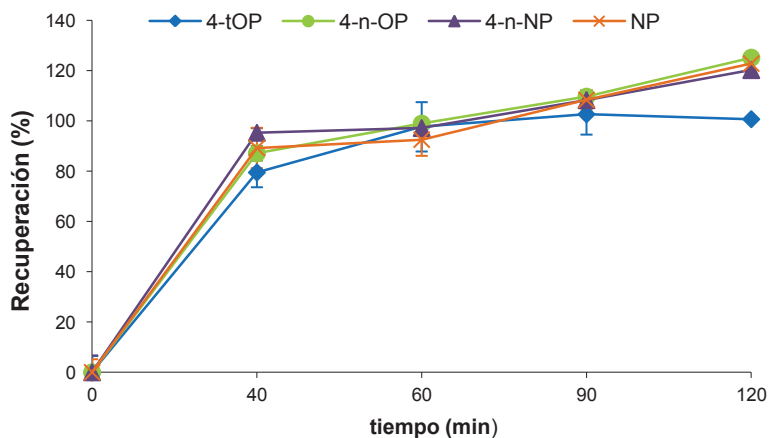


Figura 34. Estudio del tiempo de extracción (n=3)

5.3. Estudio del efecto matriz

Para comprobar el efecto matriz en el método propuesto, éste se aplica a otro tipo de aguas, concretamente a aguas superficiales y aguas de consumo. Las recuperaciones analíticas obtenidas varían entre 85 y 110%, con una DER inferior al 10% para ambos tipos de agua. Estos valores demuestran un bajo efecto matriz (menor al 20%) favorecido por el uso de membranas que actúan como una barrera de macromoléculas que pueden afectar a la ionización de los analitos. Por todo lo anteriormente comentado, la metodología puede ser aplicada al análisis de aguas superficiales y de abastecimiento sin ninguna modificación, utilizando patrones internos subrogados para la cuantificación de los compuestos.

5.4. Estudio de validación de método

Las condiciones del método de MASE-LC-MS/MS desarrollado son: 15 mL de agua de mar se extraen con 500 μ L de hexano (introducidos en una membrana de HDPP) durante 60 minutos a 750 rpm. El extracto obtenido se evapora mediante corriente de nitrógeno a sequedad y se redisuelve en 1 mL de metanol. La determinación por LC-MS/MS se lleva a cabo bajo las condiciones comentadas en este Capítulo (pág. 102).

El estudio de validación se lleva a cabo con muestras sobrecargadas debido a la ausencia de materiales de referencia de estos compuestos en las matrices bajo

estudio. Los resultados obtenidos para cada compuesto en términos de linealidad, exactitud, precisión y estimación de la incertidumbre se muestran en la Tabla 20.

La linealidad del método se ha estudiado con un calibrado de siete puntos ($n=2$) comprendidos entre 0,01 y 20 $\mu\text{g/L}$. El rango es lineal ($r^2 > 0.9975$) en el intervalo de MQL a 5 ó 10 $\mu\text{g/L}$ dependiendo del compuesto y del tipo de agua.

Tabla 20. Rango lineal, recuperaciones analíticas absolutas (RA%) y relativas (RE%), desviaciones estándar relativas (%) para la repetibilidad y precisión intermedia, e incertidumbre expandida relativa ($U_{\text{exp}}\%$) obtenidas con el método analítico a tres niveles de concentración en los distintos tipos de agua

Tipo de agua	Analito	Rango lineal ($\mu\text{g/L}$) (r^2)	Concentración muestra ($\mu\text{g/L}$)	Exactitud (%)		Precisión (%)		U_{exp} (%)
				RA ($n=7$)	RR ($n=7$)	Rep ($n=7$)	PInter ($n=10$)	
Agua de mar	4-tOP	MQL-5 (0,9992)	0,05	44	108	9	20	25
			0,25	46	99	6	7	22
			1,25	41	94	9	8	21
	4-n-OP	MQL-10 (1)	0,05	46	91	6	12	21
			0,25	48	98	3	3	20
			1,25	48	101	6	6	20
	4-n-NP	MQL-5 (0,9992)	0,05	43	81	10	15	22
			0,25	48	90	11	12	21
			1,25	47	98	10	8	21
	NP	MQL-10 (0,9999)	0,05	66	101	8	11	21
			0,25	41	85	14	19	23
			1,25	42	82	4	14	22
Agua superficial	4-tOP	MQL-5 (0,9975)	0,05	46	93	10	14	23
			0,25	42	102	5	13	28
			1,25	50	103	4	12	21
	4-n-OP	MQL-5 (0,9993)	5	49	98	15	15	22
			0,25	46	104	3	5	27
			1,25	50	95	5	12	20
	4-n-NP	MQL-10 (0,9997)	0,05	46	87	7	13	22
			0,25	44	94	5	5	26
			1,25	54	97	3	3	20
	NP	MQL-10 (0,9998)	0,05	50	90	15	13	21
			0,25	42	89	3	10	27
			1,25	48	91	5	7	21
Agua consumo	4-tOP	MQL-10 (0,9991)	0,05	40	87	8	13	21
			0,25	47	87	11	12	21
			1,25	40	87	13	14	22
	4-n-OP	MQL-5 (0,9994)	0,05	41	90	9	9	22
			0,25	50	96	13	14	21
			1,25	46	95	8	8	20
	4-n-NP	MQL-10 (0,9981)	0,05	41	95	13	13	21
			0,25	49	94	9	10	20
			1,25	46	95	5	6	20
	NP	MQL-10 (0,9995)	0,05	40	101	16	16	24
			0,25	50	85	10	11	21
			1,25	40	86	9	10	21

Por su parte, la exactitud y precisión del método se han determinado en tres niveles de concentración diferentes, teniendo en cuenta el rango lineal: bajo (0,05 $\mu\text{g/L}$), medio (0,25 $\mu\text{g/L}$) y alto (1,25 $\mu\text{g/L}$). De nuevo, la cuantificación de los APs en las muestras se realiza utilizando patrones internos subrogados. Los resultados obtenidos se consideran satisfactorios, pues las recuperaciones varían entre 81 y 108%, con una repetibilidad menor del 15% y una precisión intermedia menor al 20%. Además, la recuperación analítica absoluta es aceptable pues está próxima al 50% para

todos los compuestos. Esto confirma que el método analítico es reproducible y exacto en el rango lineal establecido para los cinco compuestos bajo estudio y en los diferentes tipos de aguas. La incertidumbre expandida relativa (%), calculada según lo descrito en la guía EURACHEM/CITAC [Ellison *y cols.*, 2000] es menor del 28% en todos los casos, para un factor de cobertura $k=2$ en un intervalo de confianza del 95%.

En la Tabla 21 se presentan los límites de detección y cuantificación estimados para los tres tipos de agua y las normas de calidad ambiental establecidas en la Directiva 2013/39/UE para aguas superficiales y agua de mar. Los blancos ($n=7$) tomados como referencia para el cálculo de los límites son muestras de agua de mar que no contiene o presenta una concentración muy pequeña de los compuestos bajo estudio. Como se puede observar, los MQL del método permiten la determinación de los compuestos a niveles inferiores establecidos por la Directiva. Además, los MQL obtenidos son 30% del valor de la norma de calidad ambiental, de acuerdo con la Directiva 2009/90/CE [Directiva-2009/90]. Aunque estos compuestos no están legislados en aguas de consumo, el método permite su análisis a concentraciones traza ($<0,04 \mu\text{g/L}$).

Tabla 21. Límites de detección (MDL) y cuantificación (MQL) para los distintos tipos de agua con MASE-LC-MS/MS. Normas de calidad ambiental (EQS) recogidas en la Directiva 2013/39/UE para aguas superficiales y aguas de mar

Compuesto	Agua de mar				Agua superficial				Agua consumo	
	Límites estimados ($\mu\text{g/L}$)		EQS Directiva ($\mu\text{g/L}$)		Límites estimados ($\mu\text{g/L}$)		EQS Directiva ($\mu\text{g/L}$)		Límites estimados ($\mu\text{g/L}$)	
	MDL	MQL	AA	MAC	MDL	MQL	AA	MAC	MDL	MQL
4-tOP	0,003	0,007	0,01	N.a*	0,002	0,005	0,1	N.a*	0,008	0,02
4-n-OP	0,0005	0,001	0,01	N.a*	0,0006	0,0015	0,1	N.a*	0,008	0,02
4-n-NP	0,001	0,003	0,3	2	0,0007	0,002	0,3	2	0,016	0,04
NP	0,003	0,012	0,3	2	0,011	0,032	0,3	2	0,015	0,04

*N.a.= no aplicable

5.5. Aplicación a muestras

Se analizan 18 muestras de agua de mar, agua superficial y agua de abastecimiento procedentes de diferentes zonas del área metropolitana de A Coruña (Figura 35), a fin de evaluar la presencia de los alquiflenoles en el ciclo de potabilización de agua de la ciudad. No se detecta la presencia de los isómeros lineales (4-n-OP y 4-n-NP) en ninguna de las muestras. El 4-tOP se determina únicamente en dos muestras de agua de mar, a concentraciones de $0,019 \mu\text{g/L}$ y menor que el MQL, ambas correspondientes a zonas próximas a actividades industriales. El primer valor supera el EQS establecido en la Directiva 2013/39/UE para el 4-tOP ($0,01 \mu\text{g/L}$). Aunque con una única muestra no se puede confirmar la contaminación de las aguas por 4-tOP, sería conveniente realizar estudios posteriores

en dicha zona para comprobar los niveles de este compuesto. En cuanto al NP, se detecta en todas las muestras, a concentraciones que varían entre el MQL y 0,19 $\mu\text{g/L}$. En ningún caso se han superado los EQS establecidos en la Directiva antes mencionada para este compuesto (0,3 y 2 $\mu\text{g/L}$). En aguas de consumo, el NP se ha podido cuantificar en una única muestra (0,25 $\mu\text{g/L}$). El hecho de que la concentración medida en este punto sea superior a la encontrada en las aguas superficiales, sugiere que la contaminación puede ser debida al sistema de suministro del agua, que suele ser de plástico (generalmente PVC).

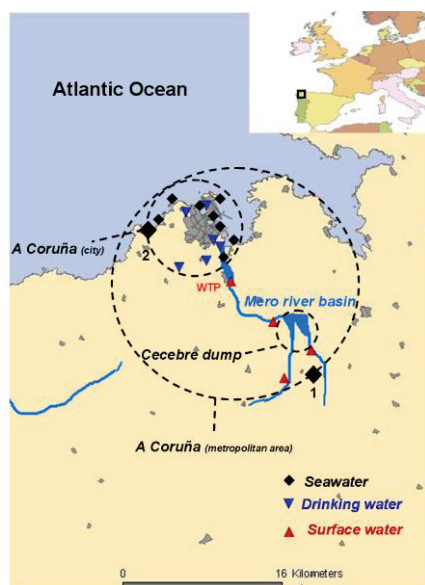


Figura 35. Localización de los puntos de muestreo de agua de mar (negro), de abastecimiento (azul) y superficial (rojo) en el área metropolitana de A Coruña [Rodil y cols., 2012]

A modo de ejemplo, en la Figura 36 se muestran los cromatogramas MRM de los compuestos detectados en las muestras bajo estudio.

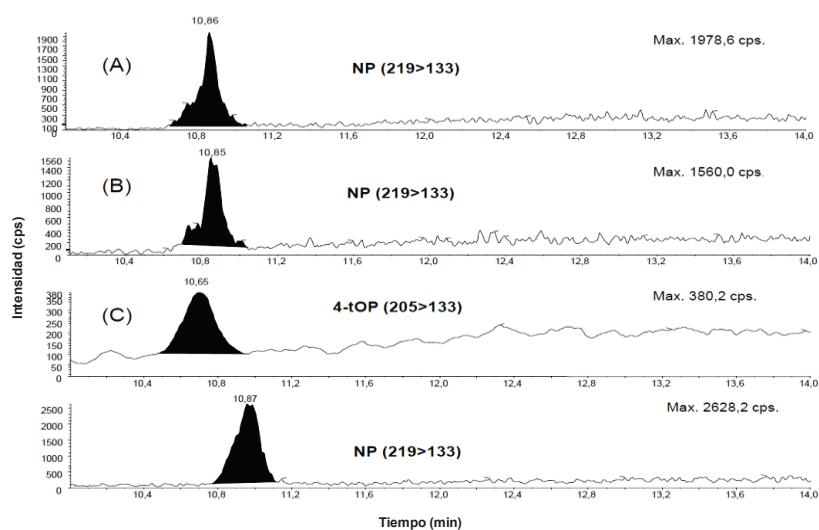


Figura 36. Cromatogramas MRM de muestras positivas de agua de abastecimiento (A), agua superficial (B) y agua de mar (C) analizadas con el método MASE-LC-MS/MS

Como se ha comentado a lo largo de este Capítulo, aunque los APs han sido ampliamente estudiados en aguas superficiales, son pocos los trabajos encontrados en la bibliografía sobre la presencia de estos compuestos en agua de mar. Por otra parte, los que hacen referencia a las aguas de consumo se basan en el análisis de aguas embotelladas, donde se estudia la posible migración de estos compuestos desde el plástico de los envases [Li *y cols.*, 2010]. Sin embargo, no se ha encontrado ningún estudio centrado en el comportamiento de estos compuestos a través del ciclo de potabilización de las aguas, lo que evidencia la importancia de este estudio inicial y el planteamiento de estudios posteriores.

6. ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS MÉTODOS DESARROLLADOS

Los métodos analíticos propuestos en este Capítulo para el análisis de EDCs en aguas se basan en técnicas de microextracción líquido-líquido. Se trata de metodologías novedosas, sencillas, miniaturizadas y sostenibles, englobadas dentro de la Química Analítica Verde, pues utilizan poca cantidad de reactivos tóxicos (<1 mL) y se generan pocos residuos durante el procedimiento experimental. Además, con ambos métodos se obtienen bajos límites de cuantificación (niveles traza) utilizando una pequeña cantidad de muestra (15-30 mL agua).

En la Tabla 22 se recoge una comparación entre ambas técnicas, en términos coste, tiempo de análisis, automatización, etc. El método de DLLME-LC-MS/MS es un método rápido, de bajo coste, que permite el análisis simultáneo de APs y BPA; por su parte, el método de MASE-LC-MS/MS requiere un mayor tiempo de análisis, tiene un coste mayor (debido a las membranas, aunque se pueden reutilizar hasta siete veces según estudios previos [Hauser *y cols.*, 2001]) y ha sido desarrollado para el análisis de APs. Sin embargo, con este segundo método se consigue alcanzar mejores límites de cuantificación en el caso de agua de mar, cumpliendo no sólo con los EQS establecidos en la Directiva 2013/39/UE si no también con la Directiva 2009/109/CE (que establece que el límite de cuantificación del método debe ser inferior al 30% de los EQS). Además, el método MASE está validado para diferentes tipos de agua. Por tanto, el aplicar uno u otro método dependerá de los objetivos requeridos en el análisis o del número de muestras a analizar.

Tabla 22. Estudio comparativo de los métodos de análisis de aguas desarrollados: DLLME-LC-MS/MS y MASE-LC-MS/MS

Aspecto	DLLME-LC-MS/MS	MASE-LC-MS/MS
Fundamento de la técnica	Formación de una nube fina de gotas de disolvente orgánico que permita la extracción de analitos de matrices acuosas	Difusión de analitos en agua a un pequeño volumen de disolvente orgánico a través de una membrana
Compuestos que permite analizar	APs y BPA	APs
Volumen de muestra	30 mL	15 mL
Disolvente de extracción	1-octanol (100 µL)	hexano (500 µL)
Tiempo de análisis	Extracción (5 min) y centrifugación (3 min)	Extracción (60 min) y evaporación
Número de réplicas por análisis	6 réplicas	12 réplicas
Automatización	Moderada	Baja
Modo de operación	Fácil	Fácil
Coste	Bajo	Moderado
Límites de cuantificación del método	<0,029 µg/L (agua de mar)	<0,012 (agua de mar) <0,032 (agua superficial) <0,04 (agua consumo)
Cumplimiento de EQS Directiva 2013/39/UE	SÍ	SÍ
Directiva 2009/109/CE	Sólo en el caso del 4- <i>n</i> -NP	SÍ

En cualquier caso, los dos métodos ofrecen ventajas y mejoras sobre otras metodologías encontradas en la bibliografía (Ver Tabla 9, págs. 42-49), la mayoría basados en técnicas de extracción líquido-líquido [Amiridou *y cols.*, 2011; Loyo-Rosales *y cols.*, 2004] o extracción en fase sólida [Careri *y cols.*, 2003; Céspedes *y cols.*, 2008] que requieren el uso de grandes cantidades de disolventes/reactivos tóxicos, grandes tiempos de extracción y que generan gran cantidad de residuos. Por otra parte, la optimización del método instrumental LC-MS y el estudio de blancos llevados a cabo permiten obtener bajos límites de cuantificación, similares [Cavalheiro *y cols.*, 2014] o mejores [Prieto *y cols.*, 2011] a los obtenidos con la GC-MS pero evitando la etapa de derivatización. Finalmente, se utilizan menos de 30 mL de muestra, en comparación con 250 mL [Matejicek *y cols.*, 2013], 500 mL [Bizkarguenaga *y cols.*, 2012] ó 1000 mL [Sánchez-Avila *y cols.*, 2011] requeridos para aplicar alguna de la metodología previamente publicada, lo que facilita el muestreo, transporte y almacenamiento de las muestras.

7. CONCLUSIONES

En este Capítulo se ha desarrollado un método instrumental de cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) para la determinación de alquilfenoles y bisfenol A, optimizando las variables relacionadas con el espectrómetro de masas, la fuente de ionización y la separación cromatográfica. Los parámetros de calidad analítica obtenidos han sido satisfactorios para todos los compuestos: coeficientes de determinación (r^2) superiores a 0,9991; buena repetibilidad y precisión intermedia (DER<9%) y límites de detección y cuantificación a niveles traza (<3 ng). Los bajos límites instrumentales alcanzados han sido obtenidos gracias al estudio de blancos instrumentales realizado, el cual ha permitido conocer las principales fuentes de contaminación (disolventes de fase móvil), eliminar la señal de 4-tOP presente en los blancos y reducir la del NP en un factor de 10000 (concentración inferior a 0,09 ng).

Se han comentado diferentes aspectos relacionados con la limpieza del material, pretratamiento (filtración de muestras y almacenamiento) y tratamiento de muestras (filtración de extractos), evidenciando la importancia de estas etapas para el determinación de estos compuestos, pues podrían dar lugar a pérdidas de analitos antes de su determinación.

Se han expuesto también dos métodos de extracción para la determinación de estos EDCs en muestras acuosas: una microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME-LC-MS/MS) y una extracción con disolvente miniaturizada asistida por membranas (MASE-LC-MS/MS). El primero de ellos permite analizar APs y BPA en muestras de agua de mar; el segundo, que está validado para tres tipos de agua (mar, superficial y abastecimiento) se centra en la determinación de los cuatro APs. Los resultados obtenidos en los estudios de validación de estos métodos han sido satisfactorios. Ambas son metodologías rápidas, sencillas, selectivas y de bajo coste y permiten alcanzar los límites establecidos en la Directiva 2013/39/UE utilizando poco volumen de muestra (<30 mL) y poco volumen de disolvente orgánico de acuerdo con los principios de la Química Analítica Verde. Estas características demuestran las ventajas de estos métodos con respecto a otros encontrados en la bibliografía, así como su aplicabilidad en programas de monitorización y control ambiental (demandados por la legislación de aguas) y en estudios ecotoxicológicos de distintos organismos vivos.

Bibliografía

- Amiridou, D., Voutsas, D. *Alkylphenols and phthalates in bottled waters*, J Hazard Mater (2011) 185, 281.
- Beck, I.C., Bruhn, R., Gandrass, J., Ruck, W. *Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of estrogenic compounds in coastal surface water of the Baltic Sea*, J Chromatogr A (2005) 1090, 98-106.
- Berkner, S., Streck, G., Herrmann, R. *Development and validation of a method for determination of trace levels of alkylphenols and bisphenol A in atmospheric samples*, Chemosphere (2004) 54, 575-584.
- Bizkarguenaga, E., Ros, O., Iparraguirre, A., Navarro, P., Vallejo, A., Usobiaga, A., Zuloaga, O. *Solid-phase extraction combined with large volume injection-programmable temperature vaporization-gas chromatography-mass spectrometry for the multiresidue determination of priority and emerging organic pollutants in wastewater*, J Chromatogr A (2012) 1247, 104-117.
- Boyd, R.K., Basic, C., Bethem, R.A., *Trace Quantitative Analysis by Mass Spectrometry*, 2008.
- Brix, R., Postigo, C., González, S., Villagrasa, M., Navarro, A., Kuster, M., de Alda, M.J.L., Barceló, D. *Analysis and occurrence of alkylphenolic compounds and estrogens in a European river basin and an evaluation of their importance as priority pollutants*, Anal Bioanal Chem (2010) 396, 1301-1309.
- Careri, M., Elviri, L., Mangia, A., Zagnoni, I. *Liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry and liquid chromatography with fluorescence detection for determination of octylphenol and nonylphenol in municipal wastewater at trace levels*, Chromatographia (2003) 57, 321-327.
- Cavalheiro, J., Monperrus, M., Amouroux, D., Preud'Homme, H., Prieto, A., Zuloaga, O. *In-port derivatization coupled to different extraction techniques for the determination of alkylphenols in environmental water samples*, J Chromatogr A (2014) 1340, 1-7.
- Céspedes, R., Lacorte, S., Ginebreda, A., Barceló, D. *Occurrence and fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates in sewage treatment plants and impact on receiving waters along the Ter River (Catalonia, NE Spain)*, Environ Pollut (2008) 153, 384-392.
- Choi, Y.S., Cho, S., Lee, C., Luu, H.M.-D., Guo, J. *Contamination of ultrapure water with bisphenol A leached from polysulfone ultrafilter*, Talanta (2012) 94, 353.
- David, A., Gómez, E., Ait-Aissa, S., Bachelot, M., Rosain, D., Casellas, C., Fenet, H. *Monitoring organic contaminants in small French coastal lagoons: comparison of levels in mussel, passive sampler and sediment*, J Environ Monit (2010) 12, 1471-1481.
- Decisión de la Comisión 2002/657/CE, de 12 de agosto de 2002, por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados. DOCE, L 221/8.
- Directiva 96/23/CE del Consejo de 29 de abril de 1996 relativa las medidas de control aplicables respecto de determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos y por la que se derogan las Directivas 85/358/CEE y 86/469/CEE y las Decisiones 89/187/CEE y 91/664/CEE. DOCE, L 125/10.
- Directiva 98/83/CE del Consejo de 3 de noviembre de 1998 relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano. DOCE, L 330/32.
- Directiva 2009/90/CE de la Comisión del 31 de julio de 2009 por la que se establecen, de conformidad con la Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, las

especificaciones técnicas del análisis químico y del seguimiento del estado de las aguas. DOUE, L 201/36.

- Ellison, S.L.R., Rosslein, M., Williams, A., *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurements*. EURACHEM/CITAC, 2000.
- Fiamegos, Y.C., Stalikas, C.D. *In-drop derivatisation liquid-phase microextraction assisted by ion-pairing transfer for the gas chromatographic determination of phenolic endocrine disruptors*, *Anal Chim Acta* (2007) 597, 32-40.
- Gallart-Ayala, H., Moyano, E., Galcerán, M.T. *Recent Advances in Mass Spectrometry Analysis of Phenolic Endocrine Disruptors and Related Compounds*, *Mass Spectr Rev* (2010) 29, 776-805.
- Hauser, B., Popp, P. *Membrane-assisted solvent extraction of organochlorine compounds in combination with large-volume injection/gas chromatography-electron capture detection*, *J Sep Sci* (2001) 24, 551-560.
- Inoue, K., Wada, M., Higuchi, T., Oshio, S., Umeda, T., Yoshimura, Y., Nakazawa, H. *Application of liquid chromatography-mass spectrometry to the quantification of bisphenol A in human semen*, *J Chromatogr B* (2002) 773, 997-102.
- Li, X., Ying, G.-G., Su, H.-C., Yang, X.-B., Wang, L. *Simultaneous determination and assessment of 4-nonylphenol, bisphenol A and triclosan in tap water, bottled water and baby bottles*, *Environ Int* (2010) 36, 557-562.
- Liu, J.F., Liang, X., Jiang, G.B., Cail, Y.Q., Zhou, Q.X., Liu, G.G. *High performance liquid chromatography determination of 4-nonylphenol, 4-tert-octylphenol, and their short ethoxyl chain polyethoxylates in water samples using a microporous membrane liquid-liquid extraction sample pretreatment technique*, *J Separ Sci* (2003) 26, 823-828.
- Liu, Y., Guan, Y.T., Tam, N.F.Y., Mizuno, T., Tsuno, H., Zhu, W.P. *Influence of Rainfall and Basic Water Quality Parameters on the Distribution of Endocrine-Disrupting Chemicals in Coastal Area*, *Water Air Soil Poll* (2010) 209, 333-343.
- Loos, R., Wollgast, J., Castro-Jiménez, J., Mariani, G., Huber, T., Locoro, G., Hanke, G., Umlauf, G., Bidoglio, G., Hohenblum, P., Moche, W., Weiss, S., Schmid, H., Leiendecker, F., Ternes, T., Ortega, A.N., Hildebrandt, A., Barceló, D., Lepom, P., Dimitrova, I., Nitcheva, O., Polesello, S., Valsecchi, S., Boutrup, S., Sortkjaer, O., de Boer, R., Staeb, J. *Laboratory intercomparison study for the analysis of nonylphenol and octylphenol in river water*, *TrAC-Trends Anal Chem* (2008) 27, 89-95.
- López-Darias, J., Pino, V., Meng, Y.J., Anderson, J.L., Afonso, A.M. *Utilization of a benzyl functionalized polymeric ionic liquid for the sensitive determination of polycyclic aromatic hydrocarbons, parabens and alkylphenols in waters using solid-phase microextraction coupled to gas chromatography-flame ionization detection*, *J Chromatogr A* (2010) 1217, 7189-7197.
- Loyo-Rosales, J.E., Rosales-Rivera, G.C., Lynch, A.M., Rice, C.P., Torrents, A. *Migration of nonylphenol from plastic containers to water and a milk surrogate*, *J Agricul Food Chem* (2004) 52, 2016-2020.
- Loyo-Rosales, J.E., Schmitz-Afonso, I., Rice, C.P., Torrents, A. *Analysis of octyl- and nonylphenol and their ethoxylates in water and sediments by liquid chromatography/tandem mass spectrometry*, *Anal Chem* (2003) 75, 4811-4817.
- Luo, S., Fang, L., Wang, X., Liu, H., Ouyang, G., Lan, C., Luan, T. *Determination of octylphenol and nonylphenol in aqueous sample using simultaneous derivatization and dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry*, *J Chromatogr A* (2010) 1217, 6762-6768.

- Martínez, E., Gans, O., Weber, H., Scharf, S. *Analysis of nonylphenol polyethoxylates and their metabolites in water samples by high-performance liquid chromatography with electrospray mass spectrometry detection*, *Water Sci Technol* (2004) 50, 157-163.
- Matejicek, D., Grycova, A., Vlcek, J. *The use of molecularly imprinted polymers for the multicomponent determination of endocrine-disrupting compounds in water and sediment*, *J Separ Sci* (2013) 36, 1097-1103.
- Moeder, M., Bauer, C., Popp, P., van Pinxteren, M., Reemtsma, T. *Determination of pesticide residues in wine by membrane-assisted solvent extraction and high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*, *Anal Bioanal Chem* (2012) 403, 1731-1741.
- Niu, Y.M., Zhang, J., Wu, Y.N., Shao, B. *Simultaneous determination of bisphenol A and alkylphenol in plant oil by gel permeation chromatography and isotopic dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry*, *J Chromatogr A* (2011) 1218, 5248-5253.
- Petrovic, M., Eljarrat, E., López de Alda, M.J., Barceló, D. *Analysis and environmental levels of endocrine-disrupting compounds in freshwater sediments*, *TrAC-Trends Anal Chem* (2001) 20, 637-648.
- Prieto, A., Vallejo, A., Zuloaga, O., Paschke, A., Sellergen, B., Schillinger, E., Schrader, S., Moeder, M. *Selective determination of estrogenic compounds in water by microextraction by packed sorbents and a molecularly imprinted polymer coupled with large volume injection-in-port-derivatization gas chromatography-mass spectrometry*, *Anal Chim Acta* (2011) 703, 41.
- Richter, P., Leiva, C., Choque, C., Giordano, A., Sepulveda, B. *Rotating-disk sorptive extraction of nonylphenol from water samples*, *J Chromatogr A* (2009) 1216, 8598-8602.
- Rodil, R., Benito Quintana, J., Concha-Graña, E., López-Mahía, P., Muniategui-Lorenzo, S., Prada-Rodríguez, D. *Emerging pollutants in sewage, surface and drinking water in Galicia (NW Spain)*, *Chemosphere* (2012) 86, 1040-1049.
- Sánchez-Avila, J., Fernández-Sanjuan, M., Vicente, J., Lacorte, S. *Development of a multi-residue method for the determination of organic micropollutants in water, sediment and mussels using gas chromatography-tandem mass spectrometry*, *J Chromatogr A* (2011) 1218, 6799.
- Schellin, M., Popp, P. *Membrane-assisted solvent extraction of polychlorinated biphenyls in river water and other matrices combined with large volume injection-gas chromatography-mass spectrometric detection*, *J Chromatogr A* (2003) 1020, 153-160.
- Schellin, M., Popp, P. *Miniaturized membrane-assisted solvent extraction combined with gas chromatography/electron-capture detection applied to the analysis of volatile organic compounds*, *J Chromatogr A* (2006) 1103, 211-218.
- Schmitz-Afonso, I., Loyo-Rosales, J.E., Aviles, M.D., Rattner, B.A., Rice, C.P. *Determination of alkylphenol and alkylphenolethoxylates in biota by liquid chromatography with detection by tandem mass spectrometry and fluorescence spectroscopy*, *J Chromatogr A* (2003) 1010, 25-35.
- Xie, Z., Selzer, J., Ebinghaus, R., Caba, A., Ruck, W. *Development and validation of a method for the determination of trace alkylphenols and phthalates in the atmosphere*, *Anal Chim Acta* (2006) 565, 198-207.
- Yiantzi, E., Psillakis, E., Tyrovolas, K., Kalgerakis, N. *Vortex-assisted liquid-liquid microextraction of octylphenol, nonylphenol and bisphenol-A*, *Talanta* (2010) 80, 2057-2062.
- Ying, G.G., Williams, B., Kookana, R. *Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates - a review*, *Environ Int* (2002) 28, 215-226.

CAPÍTULO IV. Análisis de alquilfenoles y bisfenol A en sedimento



- *Desarrollo y validación de dos métodos novedosos basados en técnicas de extracción con líquidos a presión (SPLE y PHWE) para determinación de alquilfenoles y bisfenol A en sedimentos a niveles traza*
- *Metodologías rápidas, sensibles, selectivas y que cumple con principios de la Química Analítica Verde. Ventajas y limitaciones de cada una de ellas*
- *Isómeros ramificados presentes en todos los sedimentos analizados (<40 ng/g dw para 4-tOP y 1409 ng/g dw para NP). BPA, 4-n-NP y 4-n-OP no detectados*

Publicaciones científicas

“Analysis of endocrine disruptor compounds in marine sediments by in cell clean-up pressurized liquid extraction-liquid chromatography tandem mass spectrometry determination”. N.Salgueiro-González, I. Turnes-Carou, S. Muniategui-Lorenzo, P. López-Mahía, D. Prada-Rodríguez. *Anal Chim Acta* (2014) 852, 112-120. Anexo IV (págs. 311 - 322)

“Pressurized hot water extraction followed by miniaturized membrane assisted solvent extraction for the green analysis of alkylphenols in sediments”. N.Salgueiro-González, I. Turnes-Carou, S. Muniategui-Lorenzo, P. López-Mahía, D. Prada-Rodríguez. *J Chromatogr A* (2015) 1383, 8-17. Anexo V (págs. 323 - 334)

Los sedimentos actúan como un depósito de contaminantes a largo plazo, lo que los convierte en un buen indicador de contaminación y, por tanto, en una de las matrices complementarias para los programas de monitorización del medio acuático. Aunque la Directiva 2013/39/UE muestra la importancia y el requerimiento del análisis de sedimentos por parte de los Estados Miembros, todavía no establece EQS debido a la falta de datos científicos. Por ello son necesarios más estudios ambientales sobre la presencia de contaminantes en esta matriz, así como estudios ecotoxicológicos, que evalúen los posibles efectos que la toxicidad de los sedimentos puede tener sobre la fauna acuática.

Por otra parte, y dado que los sedimentos pueden comportarse como una fuente de contaminación por re-suspensión [Liu *y cols.*, 2014], son una pieza clave para la distribución de contaminantes en el medio acuático, sobre todo en el caso de compuestos que presentan altos índices de adsorción, como los derivados fenólicos [Vega Morales *y cols.*, 2009].

La presencia y distribución de alquilfenoles y bisfenol A en el medio marino sigue siendo un tema de actualidad debido al número limitado de estudios disponibles en la bibliografía. A fin de aportar nuevos datos que sirvan de ayuda para aclarar el comportamiento de estos EDCs en el ecosistema marino, de acuerdo con la Directiva Marco sobre la Estrategia Marina 2008/56/EC [Directiva-2008/56/CE], se requiere una metodología analítica sensible y selectiva (que permita alcanzar bajos límites de cuantificación), rápida, sencilla y que requiera una cantidad reducida de muestra, para facilitar su incorporación en programas de monitorización ambiental.

En este Capítulo se describen dos métodos analíticos novedosos, selectivos, sensibles, parcialmente automatizados para la determinación de alquilfenoles y bisfenol A en sedimentos, utilizando como técnica instrumental la cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas (LC-MS/MS). El primero de ellos se basa en una extracción con líquidos a presión selectiva (SPLE-LC-MS/MS) y el segundo en una extracción con agua sobrecalentada (PHWE-LC-MS/MS). Ambas metodologías son sostenibles, aunque la segunda lo es más ("perfil verde" mayor) pues utiliza agua como disolvente de extracción. Tras detallar los aspectos clave de la optimización, validación y aplicación a muestras de las metodologías se muestra una comparativa entre ambas, comentando también las mejoras con respecto a otros métodos encontrados en la bibliografía.

1. REACTIVOS, MATERIAL E INSTRUMENTACIÓN

Los patrones individuales de los EDCs bajo estudio y sus correspondientes deuterados, así como los reactivos e instrumentación utilizados para la determinación instrumental son los comentados en el Capítulo III (pág. 94).

Las técnicas de extracción utilizadas en ambos casos (SPLE y PHWE) se llevan a cabo con un sistema de extracción acelerada ASE® 200 (Dionex, Sunnyvale, CA, U.S.A.), con celdas de extracción de acero inoxidable de 11 mL y filtros de fibra de vidrio (Ø 19.8 mm) de Whatman (Kent, UK). En el caso de la extracción con líquidos a presión selectiva (SPLE) se utiliza metanol 205, calidad SPS de Romil Ltd (Cambridge, Reino Unido) como disolvente de extracción, octadecilsilano (C₁₈) de Sigma (St. Louis, MO, USA) como agente dispersante y los siguientes adsorbentes para la purificación simultánea, previamente lavados y activados: alúmina neutra grado I (350°C, 12h), alúmina básica (350°C, 12h), Florisil®(450°C, 12h) y gel de sílice (450°C, 12h) también de Sigma (St. Louis, MO, USA). Para la evaporación de los extractos de SPLE se utiliza un evaporador Syncore® Analyst de Büchi (Flawil, Suiza).

En el caso de la extracción con agua sobrecalentada (PHWE) se emplea agua ultrapura resistividad específica=18 MΩ/cm), de Millipore Corp. (Bedford, MA, USA) como disolvente de extracción. Posteriormente se realiza una extracción con disolvente miniaturizada asistida por membranas (MASE); los reactivos y el material necesarios para llevarla a cabo se han comentado anteriormente, en el Capítulo III (pág. 94).

2. DESARROLLO DE UN MÉTODO DE EXTRACCIÓN SELECTIVA CON LÍQUIDOS A PRESIÓN (SPLE) Y DETERMINACIÓN POR LC-MS/MS PARA EL ANÁLISIS DE APS Y BPA EN SEDIMENTO

La metodología seleccionada en este caso (SPLE-LC-MS/MS) consta de las siguientes etapas principales: extracción con líquidos a presión selectiva (SPLE) con purificación “in-cell” simultánea, concentración de los extractos y determinación mediante LC-MS/MS. La concentración de los extractos se lleva a cabo a 50°C durante 45 min, temperatura y tiempo necesarios para evaporar el extracto sin que tengan lugar pérdidas de analitos; por otra parte, las características de la determinación instrumental ya han sido explicadas en el Capítulo III (pág. 102).

2.1. Preparación de la muestra

La puesta a punto del método analítico se lleva a cabo con muestras de sedimento marino que presentan bajas concentraciones de los compuestos considerados. Una pequeña cantidad de sedimento previamente liofilizado (0,5 g) y tamizado a través de 250 micras se sobrecarga con una concentración conocida de los EDCs seleccionados y se almacena a 4°C durante 24 h, para conseguir una mayor interacción analito-matriz.

A continuación, la muestra se mezcla con el agente dispersante durante 5 min en mortero de ágata y se introduce en la celda de PLE, donde se coloca previamente el adsorbente de purificación. El esquema de llenado de la celda se ha detallado con anterioridad (Capítulo II pág. 61) cuando se ha explicado el fundamento teórico de la SPLE.

2.2. Problemas de contaminación de blancos

Las celdas de extracción y los filtros de fibra de vidrio se lavan con el disolvente de extracción (MeOH) a 100°C durante 5 min. Por su parte, los adsorbentes (C_{18} y alúmina básica) se lavan con este mismo disolvente durante 15 min en baño de ultrasonidos y se secan bajo corriente de nitrógeno antes de su uso en el procedimiento experimental.

Tras aplicar este protocolo de limpieza, los blancos obtenidos son reproducibles y menores de 0,05 ng/g para todos los compuestos, excepto para el BPA (0,2 ng/g), el 4-tOP (0,9 ng/g) y el NP (1,5 ng/g).

2.3. Estudio de las variables de la SPLE

El primer parámetro a considerar es la elección del adsorbente utilizado en la purificación simultánea, pues es uno de los más importantes de la SPLE. La optimización se lleva a cabo de modo univariante, examinando cuatro adsorbentes: alúmina neutra, alúmina básica, gel de sílice y Florisil® (Figura 37). Los adsorbentes son lavados con el disolvente de extracción y activados adecuadamente antes de su uso. El resto de parámetros son los siguientes: temperatura, 40°C; presión, 1500 psi; tiempo de extracción, 5 min; número de ciclos, 1; agente dispersante, C_{18} (1,5 g) y cantidad de adsorbente, 3 g.

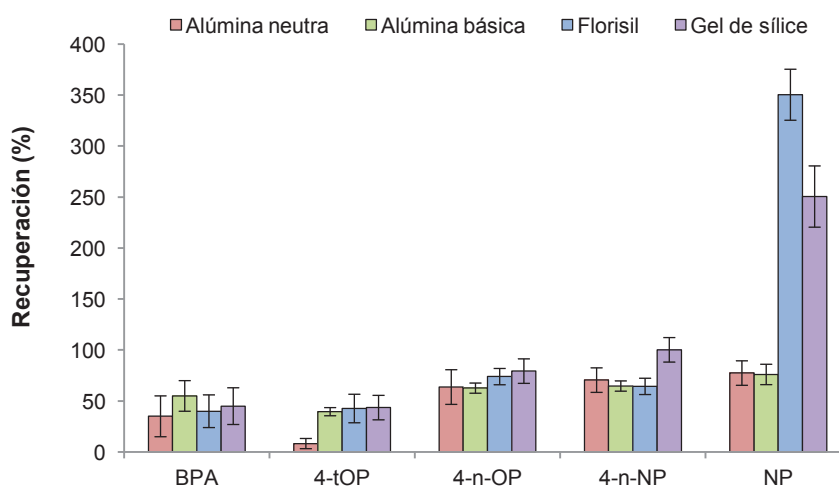


Figura 37. Selección del adsorbente utilizado en la etapa de purificación (n=3)

El uso de gel de sílice y Florisil® se descarta debido a altas recuperaciones observadas (mayores de 200%) para el NP. En el caso de la alúmina neutra se han obtenido bajas recuperaciones para el BPA y el 4-tOP (menores de 30%), además de valores de desviación estándar mayores que para la alúmina básica. Por ello, el adsorbente seleccionado es la alúmina básica.

La cantidad de alúmina básica se optimiza junto con otros parámetros que condicionan la extracción SPLE (temperatura, agente dispersante, número de ciclos, etc.) de un modo multivariante, a fin de reducir el tiempo y el número de ensayos que serían necesarios para realizar una optimización univariante de cada uno de los parámetros. Se plantea un diseño de experiencias Plackett-Burman $2^7 \times 3/32$ con ayuda del software Statgraphics 4.0 para Windows; los valores máximos y mínimos de cada uno de los factores considerados en el diseño se muestran en la Tabla 23.

Tabla 23. Valores máximos y mínimos de los distintos parámetros considerados en el diseño de experiencias para la optimización de las condiciones de SPLE

	Parámetros	Valor mínimo	Valor máximo
A	Temperatura de extracción (°C)	40	100
B	Número de ciclos	1	2
C	Agente dispersante 0,5 g C18*	0	1
D	Tiempo de extracción (min)	5	15
E	Cantidad de alúmina básica (g)	1	4
F	Fantasma	-1	1
G	Fantasma	-1	1

*Se han llevado a cabo ensayos con (1) y sin (0) agente dispersante C₁₈

Una vez se llevan a cabo los experimentos (n=3) se obtienen las cartas Pareto de primer orden (P=95%), mostradas en la Figura 38. No se observan variables significativas para el BPA y los alquilfenoles lineales; sin embargo, resultan significativos el agente dispersante y la temperatura de extracción para el NP y el 4-tOP, respectivamente. El resto de variables se fijan teniendo en cuenta el signo del efecto estimado así como otras condiciones experimentales: se seleccionan valores bajos de tiempo de extracción (10 min) y número de ciclos (1 ciclo) para acortar el tiempo de análisis, y se reduce la cantidad de alúmina básica (2 g) de manera que se minimice el consumo de reactivos y la generación de residuos (Química Analítica Verde). Las cartas Pareto de segundo orden (P=95%) no muestran interacciones entre variables.

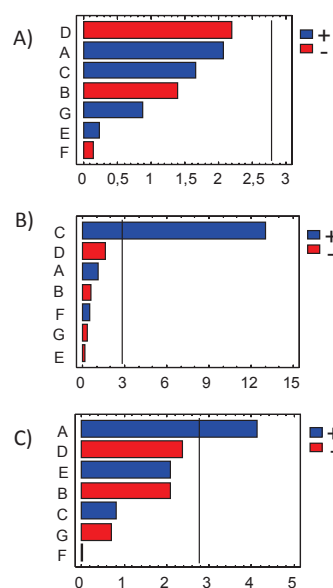


Figura 38. Cartas Pareto estandarizadas obtenidas para BPA (A), NP (B) y 4-tOP (C). Los factores estudiados han sido: A, Temperatura de extracción (°C); B, Número de ciclos; C, Agente dispersante; D, Cantidad de alúmina básica (g); E, Tiempo de extracción (min); F, Fantasma y G, Fantasma. La escala en el eje de las x es el efecto estandarizado de cada factor

Las variables significativas se optimizan de un modo multivariante mediante un diseño composicional centrado (2^2 + estrella) con 10 ensayos aleatorios. Los valores máximos y mínimos de cada variable se seleccionan teniendo en cuenta recomendaciones y/o limitaciones experimentales: de 75 a 185°C de temperatura de extracción y de 0,5 a 1,5 g de agente dispersante. En la Figura 39 se muestran los resultados obtenidos, representados como diagramas de superficie de respuesta.

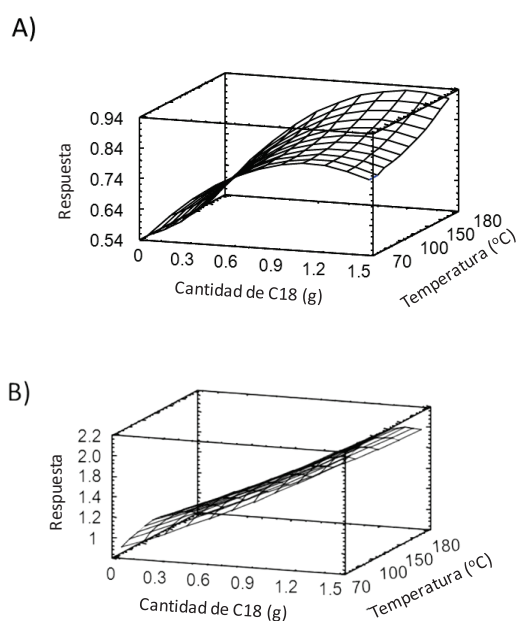


Figura 39. Diagramas de superficie de respuesta de un diseño composicional obtenidas para el par temperatura/agente dispersante en la extracción de (A) 4-*n*-octilfenol y (B) nonilfenol

Aunque todos los compuestos muestran una mayor respuesta al utilizar 1,5 g de C₁₈, la respuesta estimada para el 4-*n*-OP disminuye al emplear cantidades superiores a 1,25 g de agente dispersante. En cuanto a la temperatura, el valor de 185°C es el óptimo para todos los compuestos excepto para el NP, donde la respuesta estimada disminuye a temperaturas superiores a 130°C. A fin de llegar a una situación de compromiso, se seleccionan los valores de 150°C y 1,4 g para la temperatura de extracción y el agente dispersante, respectivamente.

2.4. Estudio del efecto matriz

Como ya se ha comentado, el efecto matriz (ME) asociado a la ionización por electrospray (ESI) en LC-MS es un fenómeno común que ha de ser estudiado, sobre todo en el caso de matrices complejas como el sedimento. Para evaluar este efecto, en este caso se compara la señal de un compuesto obtenida al someter una muestra sobrecargada con una concentración conocida de dicho compuesto al procedimiento experimental antes mencionado, con la de un patrón de la misma concentración, de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$ME = \frac{\text{Área compuesto muestra}}{\text{Área compuesto patrón}} * 100$$

Como ya se ha mencionado, porcentajes próximos al 100% indican ausencia de efecto matriz; sin embargo, porcentajes superiores o inferiores a dicho valor muestran la interferencia de los componentes presentes en la matriz, reflejada en un aumento o supresión de señal, respectivamente.

En este caso se obtienen valores de ME entre 25-37%, lo que indican una elevada supresión de señal; por ello, la cuantificación de los compuestos se lleva a cabo con rectas de adición estándar a fin de obtener resultados fiables.

2.5. Estudio de validación del método

Las condiciones finales del método SPLE-LC-MS/MS desarrollado son las que siguen: temperatura, 150°C; presión, 1500 psi; tiempo de extracción, 10 min; número de ciclos, 1; agente dispersante, C₁₈ (1,4 g) y cantidad de adsorbente, 2 g. Los extractos de PLE se evaporan a 50°C durante 45 min en un evaporador automático y se redisuelven en 1 mL de metanol. El extracto final se filtra a través de PTFE y se inyecta en el LC-MS/MS, bajo las condiciones comentadas en la pág. 102 del Capítulo III.

El método se valida en términos de linealidad, exactitud, precisión y límites de detección y cuantificación (MDL y MQL) tomando como referencia lo establecido en la Decisión de la Comisión 2002/657/EC [Decisión-2002/657]. La estimación de la incertidumbre también se incluye en este estudio, en base a las pautas establecidas en la guía de EURACHEM/CITAC [Ellison *y cols.*, 2000]. Los valores obtenidos para estos parámetros analíticos se recogen en la Tabla 24.

Para establecer el rango lineal del método se realiza una recta de adiciones estándar de diez puntos ($n=3$) en el rango de concentraciones de 0,001 a 10000 ng/g. La respuesta ha sido lineal desde el MQL a 2000 ng/g, con coeficientes de correlación (r^2) superiores a 0,9985.

La exactitud y precisión, expresada como repetibilidad y precisión intermedia, del método para cada compuesto se determina a dos niveles de concentración diferentes: 20 y 200 ng/g dw. Se obtienen valores satisfactorios, pues las recuperaciones varían entre 94 y 100% con valores de DER inferiores al 6%. La incertidumbre expandida relativa (%) es menor del 20% en todos los casos, para un factor de cobertura de $k=2$ a un nivel de confianza del 95%.

Tabla 24. Recuperaciones analíticas (R%), desviaciones estándar relativa (DER%) para la repetibilidad ($n=6$) y precisión intermedia ($n=10$) obtenidas a dos niveles de concentración diferentes en muestra. Límites de detección y cuantificación del método SPLE-LC-MS/MS e incertidumbre expandida U_{exp} ($k=2$, 95% confianza)

Compuesto	Concentración muestra $\pm U_{exp}$ (ng/g dw)	Exactitud	Precisión (DER%)		Límites de método (ng/g dw)	
		R (%) ($n=6$)	Repetibilidad ($n=6$)	Precisión inter ($n=10$)	MDL	MQL
BPA	20 \pm 3,4	94	4	5	0,97	2,8
	200 \pm 34	100	1	2		
4-tOP	20 \pm 4	97	4	5	0,87	2,9
	200 \pm 12	100	4	4		
4- <i>n</i> -OP	20 \pm 4,2	95	2	6	0,09	0,26
	200 \pm 20	99	2	5		
4- <i>n</i> -NP	20 \pm 2,6	99	2	3	0,05	0,17
	200 \pm 16	99	4	5		
NP	20 \pm 4,2	95	4	6	1,2	4,0
	200 \pm 14	97	4	5		

Los valores de los MQL son menores de 4,0 ng/g dw (NP) para todos los compuestos, por lo que se puede afirmar que el método de SPLE-LC-MS/MS permite el análisis de alquiflenoles y bisfenol A en sedimento marino a niveles de traza.

2.6. Aplicación a muestras

Se analizan cinco muestras de sedimento superficial (0-5 cm de profundidad) recogidos en diferentes puntos de un estuario gallego utilizando una draga Van-Veen. A su llegada al laboratorio, las muestras se congelan a -20°C, liofilizadas, se homogenizan y se tamizan a través de 250 μ m.

Los isómeros lineales (4-*n*-OP y 4-*n*-NP) no se detectan en ninguna muestra mientras que los ramificados se miden en todas ellas a concentraciones entre 20,1-38,9 ng/g dw y 190-1409 ng/g dw para el 4-tOP y el NP, respectivamente. Por su parte, el BPA se determina en un único punto de muestreo, a una concentración de 11 ng/g dw. A modo de ejemplo, en la Figura 40 se muestran los cromatogramas MRM de los compuestos determinados en el punto de muestreo antes mencionado.

Los valores observados son del mismo orden que los registrados en otras zonas similares, como el golfo de Vizcaya [Puy-Azurmendi *y cols.*, 2010], e inferiores a zonas altamente industrializadas como la bahía de Tokio o la bahía Masan (Corea), donde se han registrado valores próximos a 20700 ng/g dw [Liu *y cols.*, 2008].

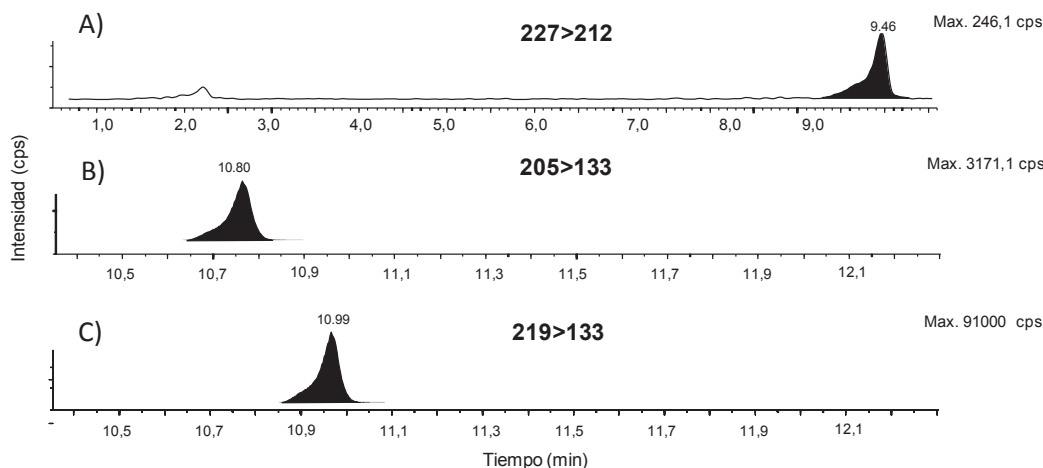


Figura 40. Cromatogramas MRM obtenidos tras el análisis de una muestra de sedimento marino con el método propuesto: (A) bisfenol A, (B) 4-tert-octilfenol y (C) nonilfenol

A fin de llevar a cabo una primera aproximación a la evaluación del posible riesgo que los valores observados en Galicia suponen para la fauna acuática de la zona, se estima la toxicidad de los sedimentos. Para ello se recurre a las unidades de toxicidad (TU), calculadas a partir de la siguiente ecuación:

$$TU = C_i / LC_{50}$$

donde C_i es la concentración de un compuesto i en agua y LC_{50} es la concentración a la que dicho compuesto produce la muerte del 50% de los individuos de la población bajo estudio. Diferentes investigaciones sugieren la presencia de efectos tóxicos en especies invertebradas con valores de TU mayores de 0,001 [Wetzel *y cols.*, 2013].

Las concentraciones en agua se determinan a partir de las concentraciones observadas en los sedimentos, utilizando coeficientes de partición sedimento-agua encontrados en la bibliografía [Di Toro, 1991]. Las especies consideradas para esta evaluación son un invertebrado (*Americamysis bahía Mollenock*, 1969) y el pez cebra (*Danio rerio Hamilton*, 1822) cuyos valores de LC_{50-96h} varían entre 0,5 y 8,04 mg/L, según la base de datos de ECOTOX [USEPA, 2008]. Los valores de TU observados para el 4-tOP, el NP y el BPA en las especies antes mencionadas son inferiores a $1,12 \cdot 10^{-4}$; por tanto, los niveles de concentración de estos compuestos en los sedimentos analizados no suponen riesgo para los organismos de este estuario.

Finalmente comentar que, aunque esta metodología se desarrolla para el análisis de sedimento marino, se aplica también al de sedimento de río, obteniéndose parámetros de calidad analítica satisfactorios (Ver Capítulo VII, pág 195-196). Debido su versatilidad, el método podría ser incluido en programas de monitorización para la evaluación de la calidad del medio acuático, de acuerdo con la Directiva 2013/39/UE [Directiva-2013/39].

3. DESARROLLO DE UN MÉTODO DE EXTRACCIÓN CON AGUA SOBRECALENTADA (PHWE) SEGUIDO DE UNA EXTRACCIÓN CON DISOLVENTE ASISTIDA POR MEMBRANAS (MASE) Y DETERMINACIÓN POR LC-MS/MS PARA ANÁLISIS DE APS EN SEDIMENTO

La metodología seleccionada en este caso (PHWE-MASE-LC-MS/MS) consta de las siguientes etapas principales: una primera extracción de los sedimentos con agua sobrecalentada (PHWE), una segunda extracción (extractos acuosos) con disolvente miniaturizada asistida por membranas (MASE) y la determinación de los analitos por LC-MS/MS. Las condiciones de la extracción MASE y de la determinación LC-MS/MS son las explicadas previamente (Capítulo III, págs. 112, 119), tras comprobarse su aplicabilidad a los extractos acuosos obtenidos mediante PHWE ($R\% > 80\%$, $DER < 10\%$ para $n=3$). Por tanto, la optimización de este método se centra en los parámetros que influyen en la extracción con agua sobrecalentada, teniendo en cuenta las características de la propia técnica (por ejemplo, las temperaturas utilizadas tienen que ser superiores a 100°C).

3.1. Problemática de contaminación de blancos

Las celdas de extracción y los filtros de fibra de vidrio se lavan con MeOH a 100°C durante 5 min. Este mismo disolvente se utiliza para el lavado del agente dispersante (C_{18}) utilizado en los ensayos de optimización (durante 15 min en baño de ultrasonidos); posteriormente se seca bajo corriente de nitrógeno. Los blancos obtenidos con esta técnica son despreciables (menores de $0,03 \text{ ng/g}$) para todos los compuestos.

3.2. Estudio de las variables de la PHWE

El desarrollo de la metodología se lleva a cabo con muestras de sedimento marino que presentan bajas concentraciones de los compuestos bajo estudio. Una pequeña cantidad de sedimento previamente liofilizado ($0,5 \text{ g}$) y tamizado por un tamiz de 250 micras se sobrecarga con una concentración conocida de los EDCs bajo estudio y se almacena a 4°C durante 24 h, para conseguir una mayor interacción analito-matriz.

A fin de reducir el número de ensayos a realizar en la optimización de las variables que influyen en la PHWE se lleva a cabo un diseño de experiencias Plackett-Burman $2^7 \times 3/32$ con ayuda del software Statgraphics 4.0 para Windows; los valores máximos y mínimos de cada uno de los factores considerados en el diseño se muestran en la Tabla 25.

Tabla 25. Valores máximos y mínimos de los distintos parámetros considerados en el diseño de experiencias para la optimización del método de PHWE

	Parámetro	Valor mínimo	Valor máximo
A	Temperatura de extracción (°C)	100	200
B	Número de ciclos	1	2
C	Agente dispersante C18*	0	1
D	Tiempo de extracción (min)	5	15
E	MeOH en disolvente extracción (%)	0	15
F	Fantasma	-1	1
G	Fantasma	-1	1

*Se han llevado a cabo ensayos con (1) y sin (0) agente dispersante C₁₈

Las cartas Pareto de primer orden ($P=95\%$) muestran que la temperatura de extracción es la variable que más influye en todos los compuestos (positivamente) y es estadísticamente significativa en el caso del 4-*n*-NP, como se puede ver en la Figura 41, por lo que se optimiza de manera univariante en un ensayo posterior. El resto de variables se fijan teniendo en cuenta el signo del efecto estimado así como otras condiciones experimentales: 2 ciclos de 7 min cada uno, extracción sin agente dispersante y 5% de MeOH en el disolvente de extracción. Se han representado las cartas Pareto de segundo orden ($P=95\%$) sin encontrarse interacciones entre variables.

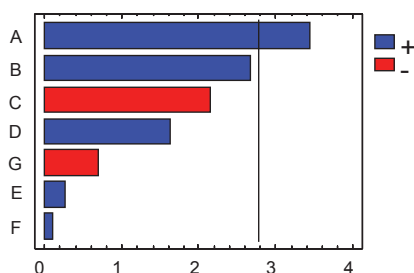


Figura 41. Cartas Pareto estandarizadas obtenidas para 4-*n*-NP. Los factores estudiados han sido: A, Temperatura de extracción (°C); B, Número de ciclos; C, Agente dispersante; D, Tiempo de extracción (min); E, Porcentaje de modificador añadido al disolvente de extracción (%); F, Fantasma y G, Fantasma. La escala en el eje de las x es el efecto estandarizado de cada factor

Para conocer la temperatura de extracción óptima se ensayan valores entre 100 y 200°C (Figura 42), obteniéndose mejores resultados a mayor temperatura de extracción; por ello, se selecciona la temperatura de 200°C ($R\% \sim 100\%$), temperatura máxima que permite el equipo de extracción (ASE®).

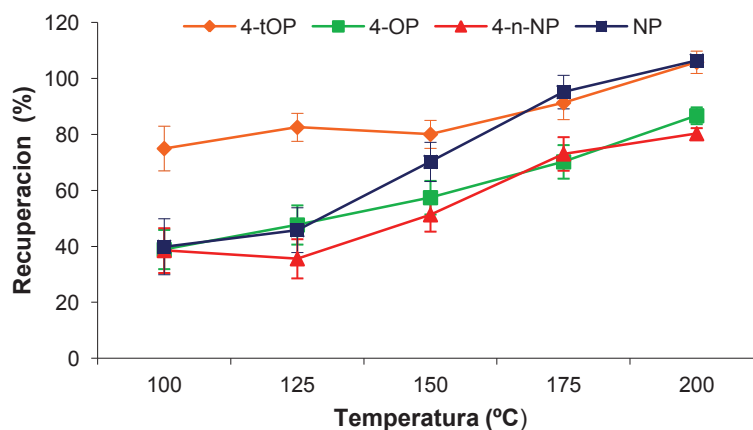


Figura 42. Efecto de la temperatura en la extracción PHWE (n=3)

3.3. Estudio del efecto matriz

De nuevo, el efecto matriz se evalúa comparando la señal de un compuesto obtenida al someter una muestra sobrecargada con una concentración conocida de dicho compuesto al procedimiento PHWE-MASE, con la de un patrón de la misma concentración, de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$ME = \frac{\text{Área compuesto muestra}}{\text{Área compuesto patrón}} * 100$$

En este caso se han obtenido valores de ME próximos al 50% para todos los compuestos, lo que indican una supresión de señal moderada. Para corregir este efecto se recurre al uso de patrones internos subrogados para la cuantificación de los compuestos (recuperaciones de 87-106%) de manera que se reduce el número de análisis con respecto a la cuantificación por adiciones estándar, minimizando el tiempo y el uso de reactivos tóxicos, de acuerdo con la Química Analítica Verde.

3.4. Estudio de validación del método

A continuación se resumen las condiciones finales del método PHWE-MASE-LC-MS/MS propuesto: 0,5 g de sedimento se introducen en la celda de PLE y se extraen con una mezcla de agua ultrapura:metanol (95:5 v/v) a una temperatura de 200°C y presión de 2000 psi durante 7 min (2 ciclos). Los extractos de PHWE (15 mL) se extraen mediante MASE con hexano (60 min, 750 rpm), se evaporan a sequedad en corriente de nitrógeno, se redisuelven en MeOH y se analizan por LC-MS/MS de acuerdo con lo comentado en el Capítulo III (págs. 112, 119).

En el estudio de validación se consideran la linealidad, la exactitud, la precisión, los límites de detección y cuantificación (MDL y MQL) [Decisión-2002/657] y la estimación de la incertidumbre de acuerdo con la guía de EURACHEM/CITAC [Ellison y cols., 2000]. Dado que no existen materiales de referencia (CRM) de APs en sedimento, el

estudio de validación se lleva a cabo con muestras sobrecargadas. Los valores obtenidos para los parámetros de calidad analítica se recogen en la Tabla 26.

Para establecer el rango lineal del método se realiza un calibrado de siete puntos ($n=2$) entre concentraciones de 0,005-2500 ng/g. La respuesta ha sido lineal desde el MQL a 1000 ng/g, con coeficientes de correlación (r^2) superiores a 0,9995.

La exactitud y precisión del método para cada compuesto se determina a dos niveles de concentración diferentes: 50 y 500 ng/g. Se obtienen valores satisfactorios recuperaciones que varían entre 93 y 102% con una DER inferior al 9%. La incertidumbre expandida relativa (%) es menor del 21% en todos los casos, para un factor de cobertura de $k=2$ a un nivel de confianza del 95%.

Tabla 26. Coeficientes de determinación (r^2), recuperaciones analíticas (R%), desviaciones estándar relativa (DER%) para la repetibilidad ($n=6$) y precisión intermedia ($n=8$) obtenidas a dos niveles de concentración diferentes en muestra. Límites de detección y cuantificación del método PHWE-MASE-LC-MS/MS e incertidumbre expandida U_{exp} ($k=2$, 95% confianza)

Compuesto	r^2	Concentración en muestra $\pm U_{exp}$ (ng/g dw)	Exactitud	Precisión (DER%)		Límites de método (ng/g dw)	
			R (%) ($n=6$)	Repetibilidad ($n=6$)	Precisión intermedia ($n=8$)	MDL	MQL
4-tOP	0,9998	50 \pm 10	103	6	8	0,030	0,077
		500 \pm 101	97	4	6		
4-n-OP	0,9999	50 \pm 10	92	3	6	0,026	0,064
		500 \pm 101	95	2	5		
4-n-NP	0,9999	50 \pm 10	93	3	5	0,024	0,061
		500 \pm 101	98	1	4		
NP	0,9996	50 \pm 10	102	7	9	0,600	1,70
		500 \pm 101	99	5	7		

Los límites de detección y cuantificación del método, estimados considerando la media y desviación estándar de los valores obtenidos al analizar blancos de sedimento marino, son menores de 1,7 ng/g dw (NP) para todos los compuestos, por lo que el método de PHWE-MASE-LC-MS/MS permite el análisis de alquilfenoles en sedimento marino a niveles de traza.

3.5. “Perfil verde” del método de análisis

Se ha evaluado el “perfil verde” del método desarrollado aplicando la Eco-escala analítica propuesta recientemente por Galuszka *y cols.* [Galuszka *y cols.*, 2012], que compara una metodología analítica determinada (en este caso PHWE-MASE-LC-MS/MS) con lo que sería el método ideal en contexto de la Química Analítica Verde, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Puntuación Eco-Escala} = 100 - \text{total PP}$$

En este caso se consideran todos los reactivos y equipos utilizados en cada una de las etapas del procedimiento analítico (PHWE, MASE, evaporación en corriente de nitrógeno y determinación LC-MS/MS); como se puede ver en la Tabla 27, se obtiene una puntuación de 76, lo que permite afirmar que el método tiene un “perfil verde” excelente de acuerdo con la Eco-escala analítica propuesta [Galuszka *y cols.*, 2012].

Etapas del procedimiento	Parámetros analíticos		Consideraciones	Cálculo de PP	
				Sub-PP	PP*
PHWE	Reactivos	Metanol	Cantidad: < 10 mL	1	1
			Riesgo	1	
	Instrumentos	ASE	Energía: > 1,5 kWh por muestra	2	
			Riesgo	0	
			Residuos	0	
MASE	Reactivos	Hexano	Cantidad: < 10 mL	1	8
			Riesgo	8	
	Instrumentos	Agitador	Energía: > 1,5 kWh por muestra	0	
			Riesgo	0	
			Residuos	1	
Evaporación	Instrumentos	Corriente de nitrógeno	Energía: < 0,1 kWh por muestra	0	0
			Riesgo	0	
			Residuos	0	
Determinación LC-MS/MS	Reactivos	Metanol	Cantidad: > 100 mL	3	1
			Riesgo	1	
		Amoniac (30%)	Cantidad: < 10 mL	1	
			Riesgo	6	
	Instrumentos	LC-MS/MS	Energía: > 1,5 kWh por muestra	2	3
			Riesgo	0	
			Residuos	1	
PP Total = 24					
Puntuación Eco-Escala = 76					

PP Instrumentos = Energía + Riesgo + Residuos

3.6. Aplicación a muestras

Se analizan cinco muestras de sedimento recogidos en diferentes puntos de la costa gallega (diferentes a los comentados en el apartado 2.6. de este Capítulo) utilizando una draga Van-Veen. A su llegada al laboratorio, las muestras se congelan a -20°C , se liofilizan, homogenizan y se tamizan a través de 250 micras.

Los APs ramificados se determinan en todas las muestras a niveles de concentración de 9,3-22 y 81,7-460 ng/g dw para el 4-tOP y NP, respectivamente. No se detecta la presencia de los APs lineales (4-*n*-OP y 4-*n*-NP) en ninguno de los puntos muestreados. En la Figura 43 se expone un cromatograma MRM de una de las muestras bajo estudio.

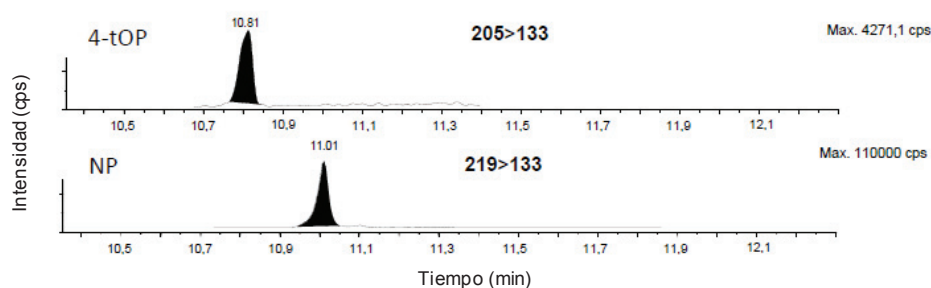


Figura 43. Cromatogramas MRM obtenidos en el análisis de una muestra de sedimento marino con el método propuesto

Estos valores son similares a los citados en otros trabajos llevados a cabo en Portugal [Petrovic *y cols.*, 2002] o Venecia (Italia) [Pojana *y cols.*, 2007], pero un orden de magnitud inferior a los observados en zonas industriales como el estuario del río Pearl en China [Gong *y cols.*, 2011].

4. ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS MÉTODOS DESARROLLADOS

Los métodos analíticos propuestos en este capítulo son novedosos, sencillos, parcialmente automatizados, lo que reduce la manipulación de muestra y, por tanto, los problemas de contaminación, y englobados dentro de la Química Analítica Verde, pues utilizan poca cantidad de reactivos tóxicos y se generan pocos residuos durante el procedimiento experimental. Además, con ambas metodologías obtienen bajos límites de cuantificación (inferiores a 4,0 ng/g dw) utilizando una pequeña cantidad de muestra (0,5 g).

En la Tabla 28 se recoge una comparación entre ambas técnicas, en términos coste, tiempo de análisis, automatización, etc. La metodología SPLE-LC-MS/MS permite el análisis de cinco compuestos (incluido el BPA), mientras que la PHWE-MASE-LC-MS/MS se ha desarrollado para la determinación de los cuatro APs. Sin embargo, esta segunda técnica permite obtener mejores límites de cuantificación que la anterior y, además, utiliza agua como disolvente de extracción, alcanzando un mejor “perfil verde”.

Por tanto, el aplicar uno u otro método dependerá de los objetivos requeridos en el análisis o del número de muestras a analizar.

Tabla 28. Estudio comparativo de los dos métodos propuestos para el análisis de alquiflenoles y bisfenol A en sedimentos

Aspecto	SPLE-LC-MS/MS	PHWE-MASE-LC-MS/MS
Compuestos que permite analizar	APs y BPA	APs
Técnica de extracción	PLE	PHWE
Disolvente de extracción	MeOH (100%)	Agua:MeOH (95:5 v/v)
Etapas de purificación	"in cell clean-up" (on line)	MASE (off line)
Cantidad de muestra	0,5 g	0,5 g
Tiempo de análisis	SPLE (10 min) + evaporación (50 min)	PHWE (14 min) + MASE (75 min)
Número de réplicas por análisis	12 réplicas	12 réplicas
Automatización	Parcial	Parcial
Modo de operación	Fácil	Fácil
Coste	Moderado	Moderado
Límites del método	<4,0 ng/g dw	<1,7 ng/g dw
"Perfil verde"	Adecuado	Excelente

En cualquier caso, los dos métodos ofrecen ventajas y mejoras sobre otras metodologías publicadas en la bibliografía (Ver Tabla 10, págs. 55-59), la mayoría basadas en técnicas de extracción convencionales como el Soxhlet [Croce *y cols.*, 2003; Mortazavi *y cols.*, 2012] o el US [Arditsoglou *y cols.*, 2012; Zhang *y cols.*, 2014] que requieren el uso de grandes cantidad de disolventes tóxicos y grandes tiempos de extracción. Aquellas que utilizan PLE como técnica de extracción suelen añadir una etapa de purificación al procedimiento experimental, generalmente una SPE [Chen *y cols.*, 2005; Duan *y cols.*, 2014; Luo *y cols.*, 2011]; sin embargo, esta técnica es tediosa y aumenta el tiempo de análisis, el uso de disolventes y la generación de residuos, aspecto mejorado con las metodologías propuestas. Por otra parte, el uso de metanol y/o agua como disolventes de extracción aumenta la selectividad de la extracción con respecto a otras mezclas como metanol:acetona (1:1 v/v) [Reid *y cols.*, 2009] o acetona:hexano (1:1 v/v) [Andreu *y cols.*, 2007; Petrovic *y cols.*, 2002], así como el "perfil verde" del método. Los límites de cuantificación obtenidos con la técnica instrumental utilizada permiten igualar [Navarro, 2010] o mejorar [Jiménez-Díaz *y cols.*, 2010] los observados utilizando GC-MS para la determinación de APs y BPA, sin ser necesaria la derivatización de los compuestos. Finalmente, se utiliza tan solo 0,5 g de muestra, en comparación con 5-10 g requeridos para aplicar alguna de la metodología de la bibliografía [Andreu *y cols.*, 2007; Céspedes *y cols.*, 2004; Jiménez-Díaz *y cols.*, 2010], facilitando el muestreo, transporte y almacenamiento de las muestras.

5. CONCLUSIONES

En este capítulo se han propuesto dos metodologías analíticas para la determinación de EDCs en sedimentos marinos. La primera de ellas basada en una extracción selectiva con líquidos a presión (SPLE-LC-MS/MS) permite la extracción y purificación simultánea de alquifenoles y bisfenol A, reduciendo el tiempo de análisis y la manipulación de la muestra; con la segunda, una extracción con agua sobrecalentada seguida de una extracción con disolvente miniaturizada asistida por membranas (PHWE-MASE-LC-MS/ME), es posible llevar a cabo el análisis de los cuatro APs bajo un “perfil verde” excelente. Los resultados obtenidos en los estudios de validación de estos métodos han sido satisfactorios. Ambas son metodologías rápidas, sencillas, selectivas y de coste moderado que permiten alcanzar bajos límites de cuantificación utilizando poca cantidad de muestra (0,5 g). Estas características muestran las ventajas de estos métodos con respecto a otros encontrados en la bibliografía, así como su aplicabilidad en programas de monitorización y control del medio acuático.

Bibliografía

- Andreu, V., Ferrer, E., Rubio, J.L., Font, G., Picó, Y. *Quantitative determination of octylphenol, nonylphenol, alkylphenol ethoxylates and alcohol ethoxylates by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-mass spectrometry in soils treated with sewage sludges*, *Sci Total Environ* (2007) 378, 124-129.
- Arditsoglou, A., Voutsas, D. *Occurrence and partitioning of endocrine-disrupting compounds in the marine environment of Thermaikos Gulf, Northern Aegean Sea, Greece*, *Mar Pollut Bull* (2012) 64, 2443-2452.
- Céspedes, R., Petrovic, M., Raldúa, D., Saura, U., Piña, B., Lacorte, S., Viana, P., Barceló, D. *Integrated procedure for determination of endocrine-disrupting activity in surface waters and sediments by use of the biological technique recombinant yeast assay and chemical analysis LC-ESI-MS*, *Anal Bioanal Chem* (2004) 378, 697-708.
- Croce, V., Patrolecco, L., Polesello, S., Valsecchi, S. *Extraction of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates from river sediments: Comparison of different extraction techniques*, *Chromatographia* (2003) 58, 145-149.
- Chen, B., Mai, B.X., Duan, J.C., Luo, X.J., Yang, Q.S., Sheng, G.Y., Fu, J.M. *Concentrations of alkylphenols in sediments from the Pearl River estuary and South China Sea, South China*, *Mar Poll Bull* (2005) 50, 993-997.
- Decisión de la Comisión 2002/657/CE, de 12 de agosto de 2002, por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados. DOCE, L 221/8.
- Di Toro, C.H., D.; Berry, W.; Swartz, R.; Cowan, C.; Pavlou, S.; Allen, H.; Thomas, N.; Paquin, P. *Technical Basis for establishing sediment quality criteria for nonionic organic chemicals using equilibrium partitioning*, *Environ Toxicol Chem* (1991) 10, 1541-1583.
- Directiva 2008/56/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 17 de junio de 2008 por la que se establece un marco de acción comunitaria para la política del medio marino (Directiva marco sobre la estrategia marina). DOUE, L 164/19.

- Directiva 2013/39/UE del Parlamento Europeo y del Consejo de 12 de agosto de 2013 por la que se modifican las Directivas 2000/60/CE y 2008/105/CE en cuanto a las sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas. DOUE, L 226/1.
- Duan, X.-Y., Li, Y.-X., Li, X.-G., Zhang, D.-H., Gao, Y. *Alkylphenols in surface sediments of the Yellow Sea and East China Sea inner shelf: Occurrence, distribution and fate*, Chemosphere (2014) 107, 265-73.
- Ellison, S.L.R., Rosslein, M., Williams, A., *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurements*. EURACHEM/CITAC, 2000.
- Galuszka, A., Konieczka, P., Migaszewski, Z.M., Namiesnik, J. *Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures*, TrAC-Trends Anal Chem (2012) 37, 61-72.
- Gong, J., Xu, L., Yang, Y., Chen, D.Y., Ran, Y. *Sequential ASE extraction of alkylphenols from sediments: Occurrence and environmental implications*, J Hazards Mater (2011) 192, 643-650.
- Jiménez-Díaz, I., Ballesteros, O., Zafra-Gómez, A., Crovetto, G., Vilchez, J.L., Navalón, A., Verge, C., deFerrer, J.A. *New sample treatment for the determination of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates in agricultural soils*, Chemosphere (2010) 80, 248-255.
- Liu, H., Cui, K., Zeng, F., Chen, L., Cheng, Y., Li, H., Li, S., Zhou, X., Zhu, F., Ouyang, G., Luan, T., Zeng, Z. *Occurrence and distribution of phthalate esters in riverine sediments from the Pearl River Delta region, South China*, Mar Poll Bull (2014) 83, 358-365.
- Liu, X.Y., Zhang, X.Y., Zhang, H.X., Liu, M.C. *A chemometric strategy for optimization of solid-phase microextraction: Determination of bisphenol a and 4-nonylphenol with HPLC*, Journal Of Chromatographic Science (2008) 46, 596-600.
- Luo, J.P., Lei, B.L., Ma, M., Zha, J.M., Wang, Z.J. *Identification of estrogen receptor agonists in sediments from WenYu River, Beijing, China*, Water Res. (2011) 45, 3908-3914.
- Mortazavi, S., Bakhtiari, A.R., Sari, A.E., Bahramifar, N., Rahbarizade, F. *Phenolic endocrine disrupting chemicals (EDCs) in Anzali Wetland, Iran: Elevated concentrations of 4-nonylphenol, octhylphenol and bisphenol A*, Mar Pollut Bull (2012) 64, 1067-1073.
- Navarro, P., Bustamante, J., Vallejo, A., Prieto, A., Usobiaga, A., Arrasate, S., Anakabe, E., Puy-Azurmendi, E., Zuloaga, O., *Determination of alkylphenols and 17 β -estradiol in fish homogenate. Extraction and clean-up strategies.*, J Chromatogr A (2010) 1217, 5890-5895.
- Petrovic, M., Fernandez-Alba, A.R., Borrell, F., Marce, R.M., Mazo, E.G., Barceló, D. *Occurrence and distribution of nonionic surfactants, their degradation products, and linear alkylbenzene sulfonates in coastal waters and sediments in Spain*, Environ Toxicol Chem (2002) 21, 37-46.
- Pojana, G., Gomiero, A., Jonkers, N., Marcomini, A. *Natural and synthetic endocrine disrupting compounds (EDCs) in water, sediment and biota of a coastal lagoon*, Environ Int (2007) 33, 929.
- Puy-Azurmendi, E., Ortiz-Zarragoitia, M., Kuster, M., Martínez, E., Guillaín, M., Domínguez, C., Serrano, T., Barbero, M.C., Alda, M.L.d., Bayona, J.M., Barceló, D., Cajaraville, M.P. *An integrated study of endocrine disruptors in sediments and reproduction-related parameters in bivalve molluscs from the Biosphere's Reserve of Urdaibai (Bay of Biscay)*, Mar Environ Res (2010) 69, S63.
- Reid, A.M., Brougham, C.A., Fogarty, A.M., Roche, J.J. *Accelerated solvent-based extraction and enrichment of selected plasticisers and 4-nonylphenol, and extraction of tin from organotin sources in sediments, sludges and leachate soils*, Anal Chim Acta (2009) 634, 197-204.
- USEPA. ECOTOX 4.0 ecotoxicology database, (2008)

- Vega Morales, T., Torres Padrón, M.E., Sosa Ferrera, Z., Santana Rodríguez, J.J. *Determination of alkylphenol ethoxylates and their degradation products in liquid and solid samples*, Trac-Trend Anal Chem (2009) 28, 1186-1200.
- Wetzel, M.A., Wahrendorf, D.-S., von der Ohe, P.C. *Sediment pollution in the Elbe estuary and its potential toxicity at different trophic levels*, Sci Total Environ (2013) 449, 199-207.
- Zhang, Z., Ren, N., Kannan, K., Nan, J., Liu, L., Ma, W., Qi, H., Li, Y. *Occurrence of Endocrine-Disrupting Phenols and Estrogens in Water and Sediment of the Songhua River, Northeastern China*, Arch Environ Contam Toxicol (2014) 66, 361-369.

CAPÍTULO V. Análisis de alquilfenoles y bisfenol A en biota



- *Desarrollo y validación de un método de extracción selectiva con líquidos a presión que permite la extracción y purificación simultánea de los compuestos bajo estudio a niveles tras.*
- *Metodología rápida, sensible, selectiva, sencilla, automatizable y que cumple con principios de la Química Analítica Verde. Parámetros de calidad analítica satisfactorios*
- *Nonilfenol y 4-tert-octilfenol determinados en todas las muestras a concentraciones menores de 300 ng/g dw*

Publicaciones científicas

“Fast and selective pressurized liquid extraction with simultaneous in cell clean up for the analysis of alkylphenols and bisphenol A in bivalve molluscs”. N.Salgueiro-González, I. Turnes-Carou, S. Muniategui-Lorenzo, P. López-Mahía, D. Prada-Rodríguez. *J Chromatogr A* (2012) 1270, 80-87. Anexo VI (págs. 335 - 354)

“Bioaccumulation of 4-nonylphenol and effects on biomarkers, acetylcholinesterase, glutathione-S-transferase and glutathione peroxidase, in *Mytilus galloprovincialis* mussel gills”. L.Vidal-Liñán, J. Bellas, N.Salgueiro-González, S. Muniategui, R. Beiras. *Environ Pollut* (2015) 200, 133-139. Anexo XI (págs. 411 – 419)

Los moluscos bivalvos, junto con distintas especies de peces, se emplean como bioindicadores de contaminación en el medio acuático [Directiva-2013/39] debido a su capacidad de acumular altas concentraciones de contaminantes y a su limitada habilidad para metabolizarlos [Fernández-González *y cols.*, 2010; Pojana *y cols.*, 2007].

Dentro del grupo de moluscos bivalvos, los mejillones son una de las especies más utilizadas para evaluar el estado ambiental del medio marino. El hecho de que se empleen en programas de monitorización ambiental de acuerdo con la Directiva Marco sobre la Estrategia Marina 2008/56/EC [Directiva-2008/56], hace necesario disponer de métodos analíticos sensibles, selectivos, rápidos y que requieran una cantidad reducida de muestra. Este tipo de metodología es de especial interés en el caso de los alquifhenoles y bisfenol A, pues su presencia y distribución en el medio marino son todavía poco conocidas, debido a la complejidad de este ecosistema [David *y cols.*, 2009].

Por otra parte, y como ya se ha comentado a lo largo de esta memoria, son necesarios más estudios ecotoxicológicos que demuestren los efectos de los APs y BPA en los organismos acuáticos, a fin de establecer valores de EQS más precisos. Este tipo de estudios requiere una determinación analítica, tanto para verificar la concentración exacta a la que se observan los efectos como para conocer la bioacumulación de los compuestos en el organismo. Por lo tanto, los métodos analíticos antes mencionados también son de gran interés en este campo de investigación.

En este Capítulo se desarrolla un método analítico novedoso, sensible, selectivo, automático y sostenible para la determinación de alquifhenoles y bisfenol A en mejillones, basado en una extracción selectiva con líquidos a presión seguida de la determinación por cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem (SPLE-LC-MS/MS). Los aspectos clave de la optimización, del estudio de validación y de la aplicación a muestras se detallan a continuación. Finalmente se muestra una comparación de la metodología propuesta con otras publicadas previamente en la bibliografía, con el fin de resaltar sus ventajas y aportaciones al análisis de estos compuestos en biota.

1. REACTIVOS, MATERIAL E INSTRUMENTACIÓN

Los patrones individuales de los compuestos bajo estudio y sus análogos deuterados, junto con los reactivos, material e instrumentación necesarios para la determinación instrumental LC-MS/MS y la limpieza del material, han sido mencionados en el Capítulo III (pág. 94).

La SPLE se lleva a cabo con un sistema de extracción acelerada ASE® 200 (Dionex, Sunnyvale, CA, EEUU), con celdas de extracción de acero inoxidable de 11 mL y filtros de fibra de vidrio (Ø 19.8 mm) de Whatman (Kent, Reino Unido). Como disolvente de extracción se utiliza metanol 205, calidad SPS de Romil Ltd (Cambridge, Reino Unido) y como agente dispersante octadecilsilano (C₁₈) de Sigma-

Aldrich (St. Louis, MO, EEUU). Para la purificación en la celda se estudian distintos adsorbentes previamente lavados con el disolvente de extracción, todos ellos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EEUU): aminopropilsílice, carbón grafitizado (200-400 malla), alúmina neutral grado I y Florisil®, estos dos últimos activados a 350°C durante 12 h).

La concentración de los extractos se realiza en un evaporador Syncore® Analyst de Büchi (Flawil, Suiza).

2. DESARROLLO DE UN MÉTODO DE EXTRACCIÓN SELECTIVA CON LÍQUIDOS A PRESIÓN (SPLE) Y DETERMINACIÓN POR LC-MS/MS PARA EL ANÁLISIS DE APs y BPA EN MEJILLONES

El procedimiento experimental consta de tres etapas principales: una extracción con líquidos a presión selectiva (SPLE), una concentración de los extractos y la determinación mediante LC-MS/MS. Dado que las dos últimas etapas ya han sido explicadas en Capítulos anteriores, en las siguientes líneas se comenta la optimización de la SPLE teniendo en cuenta tanto los parámetros de la extracción como el adsorbente para la purificación “in-cell”.

2.1. Preparación de la muestra

La puesta a punto del método analítico se lleva a cabo con muestras de mejillón salvaje (*Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819) que presentan bajas concentraciones de los compuestos bajo estudio. Una pequeña cantidad de mejillón previamente liofilizado (0,5 g) se sobrecarga con una concentración conocida de los EDCs bajo estudio y se almacena a 4°C durante 24 h, para conseguir una mayor interacción analito-matriz.

Posteriormente la muestra se dispersa con C₁₈ durante 5 min en mortero de ágata y se introduce en la celda de PLE, donde previamente se ha colocado el adsorbente de purificación. El esquema de preparación de la celda se ha detallado con anterioridad en el Capítulo II (pág. 61). Debido a la elevada presencia de la mezcla técnica NP en las muestras de mejillón utilizadas para los ensayos de optimización, este compuesto no se tiene en cuenta a la hora de seleccionar las condiciones óptimas de la SPLE pero sí en el estudio de validación en el que se emplea otro lote de muestras.

2.2. Estudio de las variables de la SPLE

Entre los parámetros que influyen en una extracción SPLE destacan el disolvente de extracción, la temperatura, el agente dispersante (y el ratio dispersante:muestra) o el adsorbente (naturaleza y cantidad) utilizado para la etapa de purificación. La optimización en modo univariante de todos estos factores

conllevaría un gran número de ensayos, por lo que parte de estas variables se seleccionan teniendo en cuenta trabajos previos encontrados en la bibliografía [Zhao y cols., 1999], así como la experiencia previa del grupo de investigación QANAP. Estos parámetros se muestran en la Tabla 29.

Tabla 29. Parámetros de la extracción con líquidos a presión selectiva fijados previamente de acuerdo con trabajos encontrados en la bibliografía [Zhao y cols., 1999]

Variable	Parámetro seleccionado	Motivo de la selección
Disolvente de extracción	MeOH	Mayor selectividad (menor co-extracción de interferentes). Menor toxicidad (Química Verde)
Temperatura de extracción	40°C (mínima temperatura permitida por el equipo)	Temperaturas altas ayudan a co-extracción interferentes y temperatura ambiente demasiada variabilidad de resultados (DER%>50)
Presión	1500 psi	Suficiente para mantener el disolvente en estado líquido (para una temperatura de 40°C)
Tiempo de extracción (ciclos)	5 min (2 ciclos)	Asegura la extracción completa de los analitos
Agente dispersante	C ₁₈	Interacciones de Van der Waals con los compuestos bajo estudio

Tras fijar estos parámetros se estudia la etapa de purificación, que se lleva a cabo simultáneamente con la extracción. En la optimización del adsorbente (*clean-up* sorbent) se estudian el Florisil®, alúmina neutra, carbón grafitizado (120/400 tamaño de malla) y aminopropilsílice, activados adecuadamente. La cantidad de adsorbente utilizada en cada caso es de 3 g; esta cantidad se ha seleccionado teniendo en cuenta la capacidad de retención de la grasa y el volumen de la celda de extracción. El resto de condiciones de extracción son las comentadas en la Tabla 27, siendo la cantidad de agente dispersante C₁₈ 2 g.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 44. Con Florisil® y carbón grafitizado se obtienen bajas recuperaciones para todos los compuestos (R% menores del 10%), probablemente debido a la retención de los analitos en estos adsorbentes [Gadzala-Kopciuch y cols., 2008]. En el caso de aminopropilsílice, las recuperaciones obtenidas son mayores (R% superiores al 60%); sin embargo este adsorbente también se descarta debido a la gran variación de los resultados en el caso del 4-tOP y 4-n-OP. El adsorbente que proporciona mejores recuperaciones es la alúmina neutra, pues permite una extracción cuantitativa de todos los compuesto, por lo que se selecciona para la etapa de purificación. La cantidad de adsorbente inicial (3 g) se mantiene, ya que se consigue eliminar correctamente la fracción lipídica sin que interfiera en el análisis.

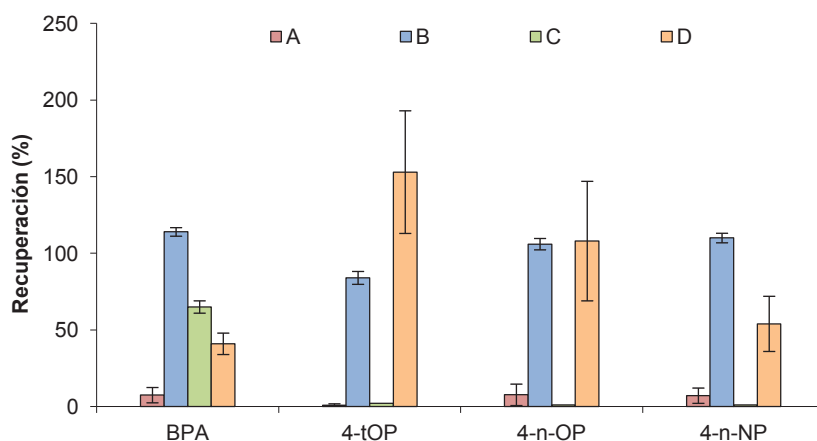


Figura 44. Selección del adsorbente utilizado en la etapa de purificación (n=2): (A) Florisil®, (B) alúmina neutra, (C) carbón grafitizado (120/400 mesh) y (D) aminopropilsílice

Otra variable optimizada de modo univariante es el ratio muestra:agente dispersante. Generalmente, se utilizan ratios que varían entre 1:1 y 1:4, dependiendo de las características físico-químicas del agente dispersante [Capriotti *y cols.*, 2010]. En este caso, los 0,5 g de muestra se mezclan con 1, 1,5 y 2 g de C₁₈ (Figura 45). Las recuperaciones obtenidas con 1,5 g son casi el doble de las obtenidas con 1 g de dispersante, y del mismo orden que las obtenidas con 2 g. Dado que los mejores resultados (mayor recuperación y menor variabilidad) se obtienen con 1,5 g, y a fin de minimizar la cantidad de agente dispersante utilizado, se escoge una proporción 1:3 muestra:agente dispersante para llevar a cabo la extracción por SPLE.

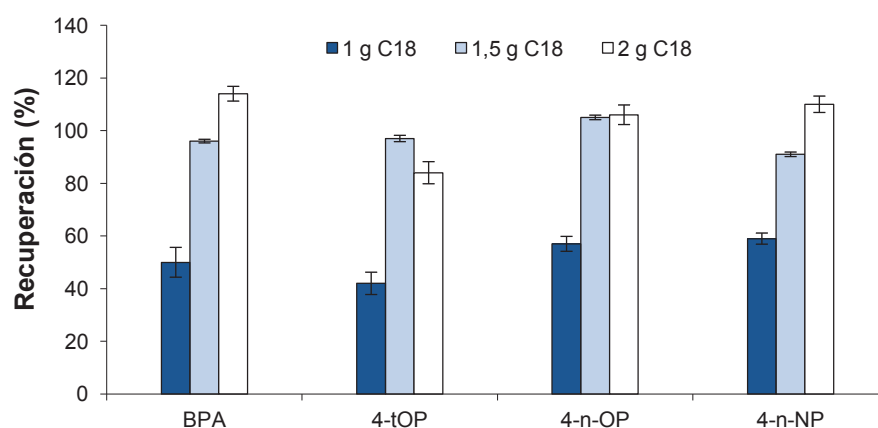


Figura 45. Estudio de la cantidad de agente dispersante (n=2)

2.3. Problemas de contaminación de blancos

Conociendo la problemática de los blancos relacionada con estos compuestos, se lleva a cabo un estudio de las posibles fuentes de contaminación en este procedimiento experimental. Inicialmente, los blancos de procedimiento muestran la presencia de BPA, 4-tOP y NP a concentraciones mayores de 5 ng/g. Estos valores son relativamente altos lo que condiciona los límites de cuantificación del método. Con el fin de minimizarlos, se establece un protocolo de limpieza que se basa en el lavado tanto del material (celdas de extracción y filtros de fibra de vidrio) como de los reactivos (C_{18} y alúmina neutra) con el disolvente de extracción (MeOH), como ya se ha detallado en el Capítulo IV (pág. 133).

Tras aplicar el protocolo de limpieza, los blancos obtenidos son menores de 0,1 ng/g para todos los compuestos, excepto en el caso del NP, cuya concentración se encuentra próxima a los 1,5 ng/g. Como se puede observar, con este protocolo se consigue reducir la señal de los blancos más de un 50%, manteniendo además un valor reproducible.

2.4. Estudio del efecto matriz

El efecto matriz (ME) se evalúa comparando la señal de un compuesto obtenida al someter una muestra sobrecargada con una concentración conocida de dicho compuesto al procedimiento experimental antes mencionado, con la de un patrón de la misma concentración, de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$ME = \frac{\text{Área compuesto muestra}}{\text{Área compuesto patrón}} * 100$$

En este caso se obtienen valores de ME inferiores al 20% que indican una elevada supresión de señal. Tras comprobar que el uso de patrones subrogados no es suficiente para corregir este efecto, se decide llevar a cabo la cuantificación mediante rectas de adición estándar. Dado que el método cromatográfico tiene una duración de 14 min, se pueden obtener resultados fiables en poco tiempo, y evitando así otra etapa de purificación, que supondría mayor tiempo de análisis, mayor consumo de reactivos, mayor generación de residuos, una posible pérdida de analitos o problemas de contaminación.

2.5. Estudio de validación del método

El método se valida en términos de linealidad, exactitud, precisión y límites de determinación (MDL y MQL), de acuerdo con la Decisión de la Comisión 2002/657/EC [Decisión-2002/657], utilizando muestras de mejillón procedentes de zonas consideradas como prístinas donde la concentración de los compuestos se espera que sea nula o muy baja. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 30 en la que se incluye también una estimación de la incertidumbre, en base a las pautas establecidas en la guía de EURACHEM/CITAC [Ellison *y cols.*, 2000].

Para establecer el rango lineal del método se realiza una recta de adiciones estándar de diez puntos ($n=3$) en el rango de concentraciones de 0,001 a 10000 ng/g. La respuesta ha sido lineal desde el MQL a 5000 ng/g, con coeficientes de correlación (r^2) superiores a 0,9985.

La exactitud y precisión del método para cada compuesto se determina en tres niveles de concentración diferentes, teniendo en cuenta el rango lineal: bajo (5 ng/g), medio (50 ng/g) y alto (500 ng/g). Se obtienen valores satisfactorios en todos los casos, pues las recuperaciones varían entre 80 y 107%, con valores de DER inferiores al 17%. Esto evidencia que el método analítico es reproducible y exacto en el rango de 5-5000 ng/g para los cinco compuestos bajo estudio.

Tabla 30. Recuperaciones analíticas (R%), desviaciones estándar relativa (DER%) para la repetibilidad ($n=7$) y precisión intermedia ($n=10$) obtenidas a tres niveles de concentración diferentes en muestra. Límites de detección y cuantificación del método propuesto e incertidumbre expandida U_{exp} ($k=2$, 95% confianza)

Compuesto	Concentración muestra $\pm U_{exp}$ (ng/g dw)	Exactitud	Precisión (%)		Límites del método	
		R(%) ($n=7$)	Repetibilidad ($n=7$)	Precisión inter ($n=10$)	MDL (ng/g dw)	MQL (ng/g dw)
BPA	5 \pm 0,55	99	8	15	0,9	3,3
	50 \pm 6,23	93	3	4		
	500 \pm 44,27	95	3	6		
4-tOP	5 \pm 2,1	80	8	13	1,1	2,6
	50 \pm 7,07	102	5	7		
	500 \pm 134,8	85	8	10		
4- <i>n</i> -OP	5 \pm 0,88	96	6	17	0,5	1,7
	50 \pm 1,71	100	4	5		
	500 \pm 128,1	88	4	6		
4- <i>n</i> -NP	5 \pm 0,55	96	9	14	0,8	2,3
	50 \pm 2,50	101	4	7		
	500 \pm 92,76	93	5	7		
NP	5 \pm 0,78	107	8	17	1,4	4,7
	50 \pm 4,61	97	5	10		
	500 \pm 171,5	87	6	7		

Los valores de los MQL son menores de 4,7 ng/g dw para todos los compuestos, por lo que el método de SPLE-LC-MS/MS permite el análisis de alquilfenoles y bisfenol A a niveles de traza en mejillón.

La incertidumbre del método analítico se estima en los tres niveles de concentración estudiados, siendo la incertidumbre expandida relativa (%) menor del 34% en todos los casos, resultados considerados satisfactorios para tratarse de concentraciones traza de los compuestos bajo estudio en una matriz compleja.

2.6. Aplicación a muestras

Tras haber obtenido resultados satisfactorios en el estudio de validación, se demuestra la aplicabilidad del método a la evaluación ambiental del estado químico del medio marino. Se analizan siete muestras de mejillón recogidas en distintos puntos de la costa de Galicia situados en las Rías Baixas. Con ello se pretende tener una primera visión de la presencia de estos compuestos en los mejillones de la costa gallega, de gran interés económico y medioambiental. Sin embargo, los análisis llevados a cabo no son más que un estudio preliminar y son necesarias nuevas y detalladas investigaciones que verifiquen y/o complementen las conclusiones obtenidas en esta memoria.

Aunque el número de muestras es limitado, es suficiente para evidenciar la distribución de los compuestos en este ecosistema. Mientras que los isómeros lineales no se detectan en ningún punto, los ramificados se miden en todas las muestras a concentraciones entre 9-31 ng/g dw para el 4-tOP y 9-372 ng/g dw para el NP. El BPA se determina en una única muestra (11,2 ng/g dw), cuyo cromatograma MRM se presenta en la Figura 46. Este punto de muestreo está cercano a Vigo, importante zona urbana (con más de 295.000 hab), portuaria e industrial. Los valores obtenidos son del mismo orden a los registrados en otras zonas costeras similares, como la costa Mediterránea [Ferrara *y cols.*, 2001; Sánchez-Avila *y cols.*, 2011].

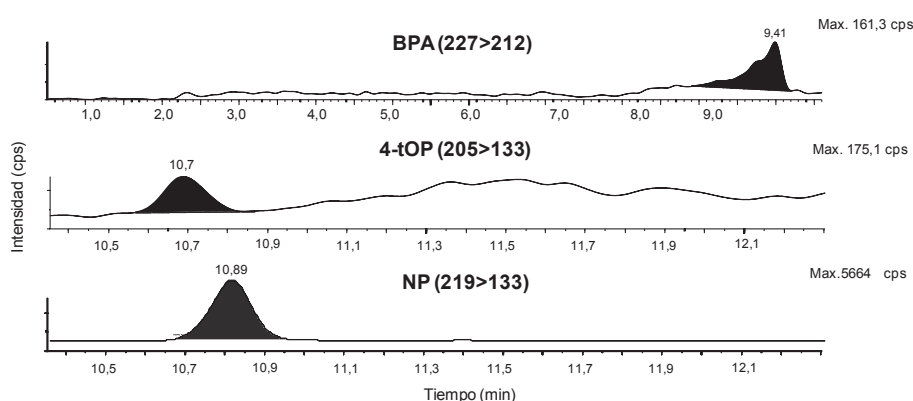


Figura 46. Cromatogramas MRM obtenidos tras el análisis de una muestra de mejillón con el método desarrollado

Con estas mismas muestras se estima el posible daño que la ingestión de dichos mejillones supondría para la salud humana. Para ello se calcula la ingesta diaria (DI), de acuerdo con la siguiente expresión:

$$DI = \frac{\text{Cantidad de mejillón consumida por persona y día, } \mu\text{g/d}}{\text{Concentración contaminante presente en mejillón, ng/g}}$$

donde la cantidad de mejillón consumida por una persona en un día se estima en 31,8 g [Ferrara y cols., 2001]). Tras realizar los cálculos oportunos y comparando los valores obtenidos (3 y 37,2 $\mu\text{g/adulto/d}$ para 4-tOP y NP, respectivamente) con los valores de ingesta diaria tolerable (TDI) establecidos por el Instituto de Seguridad y Toxicología de Dinamarca (300 $\mu\text{g/adulto/d}$ para NP) y otros estudios encontrados en bibliografía (600 $\mu\text{g/adulto/d}$ para 4-tOP) [Ferrara y cols., 2008], se concluye que no existe riesgo si se consumen estos mejillones. Sin embargo, la ingestión no es la única vía de exposición a EDCs y otras como la inhalación o el contacto dérmico tienen que ser también consideradas.

La metodología desarrollada también se aplica al análisis de organismos utilizados en estudios ecotoxicológicos, en colaboración con el Departamento de Ecología e Biología Animal de la Universidad de Vigo. En esta colaboración, en el marco del proyecto “*Criterios de calidad ambiental para ecosistemas marinos (Crisismar)*” (Ref. CTM2009-10908), se estudia la bioacumulación y efectos del isómero lineal 4-*n*-NP en mejillón (*Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819), evaluando para ello distintos biomarcadores como las enzimas acetilcolinesterasa, glutatión S-transferasa y glutatión peroxidasa. Los resultados obtenidos muestran que este compuesto tiene un gran poder de bioacumulación en estos organismos, lo que pone de manifiesto la importancia de su análisis.

Cabe destacar que aunque el método ha sido desarrollado para el análisis de mejillones, su aplicación ha resultado satisfactoria en otros organismos como la almeja asiática (*Corbicula fluminea* Müller, 1774), tal y como se comenta en el Capítulo VII (págs. 195-196). Esto demuestra la versatilidad de la técnica, que podría ser aplicada también para la evaluación de la calidad del medio acuático, de acuerdo con la Directiva 2013/39/UE [Directiva-2013/39], y no sólo para la monitorización del medio marino.

3. ESTUDIO COMPARATIVO DE MÉTODOS DE ANÁLISIS

El método SPLE-LC-MS/MS propuesto es novedoso, pues hasta el momento no se ha aplicado al análisis de APs y BPA en biota; pero, además, presenta numerosas ventajas frente a otros encontrados en la bibliografía (Ver Tabla 11, págs. 65-69), como la sensibilidad, selectividad, automatización o sostenibilidad.

En primer lugar permite la extracción y purificación simultánea (*in-cell clean up*), lo que únicamente se consigue en otras técnicas como la dispersión de matriz en fase sólida (MSPD) [Zhao y cols., 1999]; sin embargo, en este caso se lleva a cabo automáticamente, evitando la preparación manual de las columnas de extracción, reduciendo así el tiempo de análisis y la manipulación de muestra por parte del analista.

Por otra parte, y gracias en gran parte a la técnica instrumental utilizada se obtienen bajos límites de cuantificación ($<4,7$ ng/g dw) utilizando tan solo 0,5 g de muestra y evitando la etapa de derivatización necesaria en el análisis por GC-MS [Meier y cols., 2005; Vallejo y cols., 2010; Wang y cols., 2007]. La pequeña cantidad de muestra necesaria en comparación con 5 ó 20 g utilizados en otros trabajos [Klosterhaus y cols., 2013; Pojana y cols., 2007], requiere de menor cantidad de agente dispersante [Ahn y cols., 2007; Schmitz-Afonso y cols., 2003], disminuyendo así el consumo de reactivos y la generación de residuos, de acuerdo con los principios de la Química Analítica Verde; además, facilita la etapa de la toma de muestra, su transporte y su almacenamiento.

4. CONCLUSIONES

Se ha optimizado y validado una metodología basada en una extracción selectiva con líquidos a presión (SPLE-LC-MS/MS) para el análisis de alquilfenoles y bisfenol A en biota. Se trata de un método novedoso, sostenible, selectivo, sensible, rápido, sencillo, parcialmente automático y que permite llevar a cabo la extracción y purificación simultánea en una sola etapa, lo que reduce el tiempo de análisis y el volumen de disolvente utilizado. Los bajos límites de cuantificación alcanzados (niveles traza) analizando poca cantidad de muestra (0,5 g) hacen que el método sea adecuado para su incorporación en programas de monitorización y control ambiental, con el fin de asegurar la protección del medio marino. Además, la metodología es también aplicable a estudios ecotoxicológicos con los que se puede conocer más información sobre los efectos y/o bioacumulación de estos compuestos en distintos organismos, así como al análisis alimentario, evaluando el impacto que supone para la salud humana la ingestión de alimentos que presenten estos compuestos.

Bibliografía

- Ahn, Y.G., Shin, J.H., Kim, H.Y., Khim, J., Lee, M.K., Hong, J. *Application of solid-phase extraction coupled with freezing-lipid filtration clean-up for the determination of endocrine-disrupting phenols in fish*, *Anal Chim Acta* (2007) 603, 67-75.
- Capriotti, A.L., Cavaliere, C., Giansanti, P., Gubbiotti, R., Samperi, R., Laganà, A. *Recent developments in matrix solid-phase dispersion extraction*, *J Chromatogr A* (2010) 1217, 2521-2532.
- David, A., Fenet, H., Gómez, E. *Alkylphenols in marine environments: Distribution monitoring strategies and detection considerations*, *Mar Pollut Bull* (2009) 58, 953-960.
- Decisión de la Comisión 2002/657/CE, de 12 de agosto de 2002, por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados. DOCE, L 221/8.
- Directiva 2008/56/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 17 de junio de 2008 por la que se establece un marco de acción comunitaria para la política del medio marino (Directiva Marco sobre la Estrategia Marina). DOUE, L 164/19.
- Directiva 2013/39/UE del Parlamento Europeo y del Consejo de 12 de agosto de 2013 por la que se modifican las Directivas 2000/60/CE y 2008/105/CE en cuanto a las sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas. DOUE, L 226/1.
- Ellison, S.L.R., Rosslein, M., Williams, A., *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurements*. EURACHEM/CITAC, 2000.
- Fernández-González, V., Concha-Graña, E., Muniategui-Lorenzo, S., López-Mahía, P., Fernández-Fernández, E., Prada-Rodríguez, D. *A matrix solid-phase dispersion-gel permeation chromatography-programmed temperature vaporisation-GC-MS procedure for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in mussel samples*, *J Separ Sci* (2010) 33, 3741-3750.
- Ferrara, F., Ademollo, N., Delise, M., Fabietti, F., Funari, E. *Alkylphenols and their ethoxylates in seafood from the Tyrrhenian Sea*, *Chemosphere* (2008) 72, 1279-1285.
- Ferrara, F., Fabietti, F., Delise, M., Bocca, A.P., Funari, E. *Alkylphenolic compounds in edible molluscs of the Adriatic Sea (Italy)*, *Environ Sci Technol* (2001) 35, 3109-3112.
- Gadzala-Kopciuch, R., Filipiak, A., Buszewski, B. *Isolation, purification and determination of 4-n-nonylphenol and 4-tert-octylphenol in aqueous and biological samples*, *Talanta* (2008) 74, 655-660.
- Klosterhaus, S.L., Grace, R., Hamilton, M.C., Yee, D. *Method validation and reconnaissance of pharmaceuticals, personal care products, and alkylphenols in surface waters, sediments, and mussels in an urban estuary*, *Environ Int* (2013) 54, 92-99.
- Meier, S., Klungsoyr, J., Boitsov, S., Eide, T., Svardal, A. *Gas chromatography-mass spectrometry analysis of alkylphenols in cod (*Gadus morhua*) tissues as pentafluorobenzoate derivatives*, *J Chromatogr A* (2005) 1062, 255-268.
- Pojana, G., Gomiero, A., Jonkers, N., Marcomini, A. *Natural and synthetic endocrine disrupting compounds (EDCs) in water, sediment and biota of a coastal lagoon*, *Environ Int* (2007) 33, 929.
- Sánchez-Avila, J., Fernández-Sanjuan, M., Vicente, J., Lacorte, S. *Development of a multi-residue method for the determination of organic micropollutants in water, sediment and mussels using gas chromatography-tandem mass spectrometry*, *J Chromatogr A* (2011) 1218, 6799.

- Schmitz-Afonso, I., Loyo-Rosales, J.E., Avilés, M.D., Rattner, B.A., Rice, C.P. *Determination of alkylphenol and alkylphenolethoxylates in biota by liquid chromatography with detection by tandem mass spectrometry and fluorescence spectroscopy*, J Chromatogr A (2003) 1010, 25-35.
- Vallejo, A., Usobiaga, A., Ortiz-Zarragoitia, M., Cajaraville, M.P., Fernandez, L.A., Zuloaga, O. *Focused ultrasound-assisted acceleration of enzymatic hydrolysis of alkylphenols and 17 beta-oestradiol glucuronide in fish bile*, Anal Bioanal Chem (2010) 398, 2307-2314.
- Wang, J., Dong, M., Shim, W.J., Kannan, N., Li, D. *Improved cleanup techniques for gas chromatographic-mass spectrometric determination of alkylphenols from biota extract*, J Chromatogr A (2007) 1171, 15-21.
- Zhao, M., van der Wielen, F., de Voogt, P. *Optimization of a matrix solid-phase dispersion method with sequential clean-up for the determination of alkylphenol ethoxylates in biological tissues*, J Chromatogr A (1999) 837, 129-138.

Sección III

Estudios ambientales

Resumen: En la sección III Estudios ambientales se evalúa la presencia de los alquilfenoles y bisfenol A en el medio acuático gallego. No existen investigaciones previas basadas en el análisis de estos contaminantes en Galicia, lo que demuestra la novedad e importancia de los dos estudios realizados.

En primer lugar se discuten los niveles observados en las distintas matrices evaluadas, a fin de conocer la distribución espacial y temporal de los compuestos bajo estudio. Además, se evalúa el “buen estado químico” del medio acuático, comparando los valores obtenidos con los EQS establecidos en la Directiva 2013/39/UE, así como con los recogidos en otras zonas de la geografía. Se estudian también las principales fuentes de contaminación de estos compuestos. Finalmente se estima, como una primera aproximación, el impacto ecológico y posible riesgo para la salud humana asociado a la presencia de estos contaminantes en las zonas bajo estudio.

La sección se divide en dos Capítulos en los que se consideran dos áreas gallegas de gran interés turístico, industrial y pesquero. En el primero de ellos (Capítulo VI) se evalúa la distribución espacial de APs y BPA en aguas de cuatro rías gallegas y el golfo de Vizcaya, mientras que en el segundo (Capítulo VII) se estudia la distribución y bioacumulación de dichos contaminantes en el tramo final de la cuenca del río Miño (muestras de agua, sedimento y biota).

Summary: The occurrence of alkylphenols and bisphenol A in Galician aquatic ecosystem is discussed in the Environmental Research Section. As far as we know, no previous studies related to the presence of the target compounds in Galicia can be found in the literature, which demonstrates the novelty and importance of our work.

Levels of APs and BPA measured in different matrices are discussed to show the spatial and temporal distribution of these pollutants. Moreover, the “good chemical status” of the aquatic ecosystem is evaluated comparing the observed concentrations with the EQS established by Directive 2013/39/EU; and also with other reported concentrations from different geographical areas around the world. Furthermore, possible anthropogenic sources of contamination with the target compounds are studied. Finally, and as a first approach, ecological and human health impacts associated to the presence of these EDCs in the environment are also estimated.

This section was divided in two Chapters in where two interesting areas of Galicia in terms of tourism, industry and fishery are considered. The first one (Chapter VI) is based on the spatial distribution of APs and BPA in waters from four estuaries of Galicia coast and Bay of Biscay; the second one (Chapter VII) is focused on the distribution and bioaccumulation of the target compounds in Minho River basin (water, sediment and biota samples).

CAPÍTULO VI. Estudio de alquilfenoles y bisfenol A en las rías gallegas



- *Primer estudio de alquilfenoles y bisfenol A en aguas de cuatro rías gallegas y la bahía de Santander*
- *Concentraciones de 4-tOP que sobrepasan la Norma de Calidad Ambiental establecida por la Directiva 2013/39/UE*
- *Puertos, estaciones depuradoras de aguas residuales y descargas industriales son las principales fuentes de contaminación*

Publicaciones científicas

“Occurrence of endocrine disrupting compounds in five estuaries of the northwest coast of Spain: Ecological and human health impact”. N. Salgueiro-González, I. Turnes-Carou, L. Viñas-Diéguez, S. Muniategui-Lorenzo, P. López-Mahía, D. Prada-Rodríguez. *Chemosphere*, (2015) 131, 241-247. Anexo VII (págs. 355 - 362)

La falta de datos sobre la presencia de los alquilfenoles y bisfenol A en el medio marino hace que sean necesarios más estudios que permitan conocer su comportamiento y distribución en este ecosistema. Por otra parte, y teniendo en cuenta que se trata de disruptores endocrinos, su análisis es imprescindible para garantizar un buen estado químico de las aguas marinas de acuerdo con la Directiva 2013/39/UE (que considera los APs como sustancias prioritarias y establece valores de EQS en aguas) [Directiva-2013/39] y la Directiva Marco sobre la Estrategia Marina 2008/56/CE [Directiva-2008/56].

Teniendo en cuenta la necesidad de nuevos estudios, estos compuestos se incluyen en el proyecto de investigación “*Estudio de la implementación de la Directiva Marco de agua en el medio marino en Galicia*” (Ref: 09MDS038103PR), financiado por la Xunta de Galicia, con el que se pretende evaluar el impacto de contaminantes orgánicos en las rías gallegas y el golfo de Vizcaya, especialmente de sustancias prioritarias consideradas en la Directiva Marco de Agua (WFD). En el desarrollo de este proyecto participan el grupo de Química Analítica Aplicada (QANAP, UDC) y el Instituto Español de Oceanografía de Vigo (IEO-Vigo).

En este Capítulo se presentan los niveles de concentración de APs y BPA en las regiones antes mencionadas, datos de gran importancia por no existir estudios previos sobre estos contaminantes en aguas de la costa de Galicia. Teniendo en cuenta la distribución espacial de los compuestos se identifican también las posibles fuentes de contaminación. Finalmente, y como una primera aproximación, se evalúan el impacto ecológico y los posibles daños que las concentraciones observadas en estas aguas supondrían para la fauna acuática y para la salud pública por ingestión de pescados y mejillones, alimentos representativos de Galicia e incluidos en la dieta de sus habitantes.

1. INTRODUCCIÓN

La Directiva Marco sobre la Estrategia Marina 2008/56/CE [Directiva-2008/56] establece un marco y unos objetivos comunes para la protección y conservación del ecosistema marino a cumplir en el año 2020. A fin de alcanzar y/o asegurar una calidad adecuada de las aguas marinas, los Estados Miembros deben evaluar el estado ecológico y el impacto que las actividades humanas pueden tener en este medio: vertidos, modificaciones hidrográficas o contaminación por sustancias peligrosas, entre otras. Dentro del grupo de sustancias peligrosas se engloban compuestos sintéticos y no sintéticos, como los considerados prioritarios por la WFD y otros cuyos efectos ambientales y toxicológicos continúan bajo estudio, entre los que se incluyen los alquilfenoles y el bisfenol A.

Como se puede observar en la Tabla 31, son pocos los trabajos encontrados en la bibliografía que recogen niveles de APs y BPA en aguas de costas y estuarios de distintas zonas del mundo. En la mayoría de los estudios se determinan los isómeros

ramificados (4-tOP y NP) y el BPA, lo que demuestra la importancia de estos compuestos como posibles contaminantes del medio marino.

Tabla 31. Niveles de concentración de alquilfenoles y bisfenol A ($\mu\text{g/L}$) en distintos estuarios (2001-2015, Web of Science™). NA=No analizado

Localización	Concentración ($\mu\text{g/L}$)					Ref
	4-tOP	4- <i>n</i> -OP	4- <i>n</i> -NP	NP	BPA	
Mediterráneo (España)	<0,1-0,3	NA	NA	<0,15-2,7	<0,1	(1)
Cataluña (España)	0,0038-0,038	NA	NA	0,079-0,521	0,007-0,035	(2)
Jamaica	0,002-0,008	NA	NA	0,077-0,420	NA	(3)
Dutch (Holanda)	NA	NA	NA	0,031-0,934	NA	(4)
Singapur	0,03-1,06	0,05-0,19	NA	0,3-2,67	0,04-0,19	(5)
Lagos Venecia (Italia)	NA	NA	NA	<0,211	<0,146	(6)
Bahía Masan (Corea)	NA	NA	NA	<0,0471	NA	(7)
Ría Aveiro (Portugal)	0,001	NA	NA	0,0015-0,035	<0,01	(8)
G. Thermaikos (Grecia)	0,0017-0,018	<0,007	NA	0,022-0,201	0,0106-0,053	(9)
Guernika (G. Vizcaya)	<0,05	<0,04	NA	0,196	0,056	(10)
A Coruña (España)	<0,008-0,11	0,0065	0,0059	<0,03-0,14	0,035	(11)
Mediterráneo (Francia)	<0,005	NA	0,03	NA	<0,01	(12)
Estuario Daliao (China)	<0,0047	NA	NA	0,084-0,777	0,0038-0,107	(13)
C. Cantábrica (España)	0,6-113	NA	NA	0,0019-0,385	0,0016-15	(14)
Bahía Santos (Brasil)	<0,013	0,019-134	<0,004	NA	<0,003-76,8	(15)
G. Gdansk (Polonia)	<0,152	NA	NA	<0,004-3,66	0,031-0,714	(16)

(1) [Petrovic *y cols.*, 2001]; (2) [Sánchez-Avila *y cols.*, 2011]; (3) [Ferguson *y cols.*, 2001]; (4) [Jonkers *y cols.*, 2005]; (5) [Basheer *y cols.*, 2004]; (6) [Pojana *y cols.*, 2007]; (7) [Li *y cols.*, 2008]; (8) [Jonkers *y cols.*, 2010]; (9) [Arditsoglou *y cols.*, 2012]; (10) [Iparraguirre *y cols.*, 2012]; (11) [Salgueiro-González *y cols.*, 2012]; (12) [Munaron *y cols.*, 2012]; (13) [Li *y cols.*, 2013]; (14) [Sánchez-Avila *y cols.*, 2013]; (15) [Lisboa *y cols.*, 2013]; (16) [Staniszewska *y cols.*, 2014]

En el caso de los isómeros lineales (4-*n*-OP y 4-*n*-NP) ocurre lo contrario: se incluyen en pocos estudios debido a que su uso industrial es limitado y su biodegradación es mayor a la de sus respectivos isómeros ramificados. Sin embargo, estudios ecotoxicológicos recientes demuestran una bioacumulación significativa del 4-*n*-NP en mejillones, por lo que a pesar de encontrarse a bajas concentraciones en las

aguas pueden llegar a afectar a la fauna acuática [Vidal-Liñán *y cols.*, 2015]; además, este compuesto se incluye en la WFD como sustancia prioritaria por lo que debe ser también estudiado.

En esta memoria se consideran dos zonas en las que no existen estudios previos referidos a estos EDCs: aguas de la costa gallega y el golfo de Vizcaya. Estas regiones pertenecen a la división de las aguas marinas Atlántico Nororiental (subdivisión golfo de Vizcaya y costas ibéricas) considerada en la Directiva Marco sobre la Estrategia Marina [Directiva-2008/56]. Pero, además, se trata de áreas de elevado interés turístico, industrial, pesquero y naval, donde se llevan a cabo actividades de acuicultura. De hecho, Galicia es el primer productor de cultivo de mejillones de Europa, con una producción anual de 250.000 toneladas (135×10^6 Euros) y el primero de marisco en España, con más de un 10% de la producción nacional [Quelle *y cols.*, 2011]; por su parte, el golfo de Vizcaya destaca por su importancia naval y pesquera, con una gran cantidad de puertos e industrias afines. Una de las actividades más destacada es la pesca de la anchoa, cuyo valor máximo se ha fijado en 23.660 toneladas al año [MAGRAMA, 2012].

En la Figura 47 se señalan las zonas costeras consideradas en este estudio: cuatro de las principales rías gallegas, tres situadas en las Rías Baixas (ría de Arousa, ría de Vigo y ría de Pontevedra) y una en las Rías Altas (ría de A Coruña, que en esta memoria engloba las rías de A Coruña, Ares-Betanzos y Ferrol, que constituyen el golfo Ártabro). Además, se estudia la bahía de Santander, como representativa del golfo de Vizcaya.

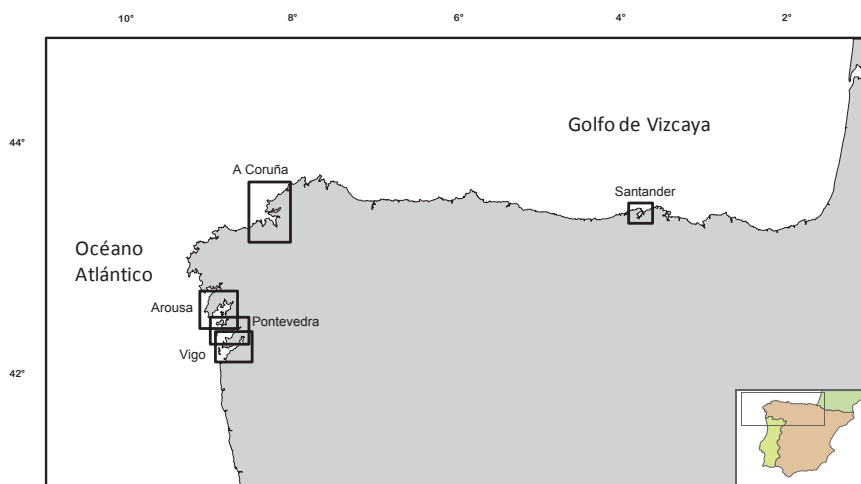


Figura 47. Localización de las rías gallegas bajo estudio (ría de Arousa, Vigo, Pontevedra y A Coruña) y la bahía de Santander

Por otra parte, en la Tabla 32 se enumeran las principales características geográficas, morfológicas, hidrográficas, poblacionales e industriales de cada una de las zonas, las cuales son de gran importancia para interpretar la distribución de los contaminantes en el medio marino.

Tabla 32. Características geográficas, hidrológicas, poblacionales e industriales de las rías gallegas bajo estudio y la bahía de Santander

Característica	Ría de Arousa	Ría de Vigo	Ría de Pontevedra	Ría de A Coruña (Golfo Ártabro)			Bahía de Santander
				Ría de A Coruña	Ría Ares-Betanzos	Ría de Ferrol	
Superficie (Km ²)	230 ^a	156 ^b	145 ^c	15,7 ^d	72 ^d	21 ^d	24,4 ^e
Municipios	Rianxo, Boiro, A Pobra do Caramiñal, Ribeira, Vilagarcía de Arousa, Vilanova de Arousa, Cambados, O Grove y A Illa de Arousa	Vigo, Baiona, Nigrán, Redondela, Soutomaior, Vilaboa, Moaña y Cangas do Morrazo	Sanxenxo, Poio, Pontevedra, Marín y Bueu	A Coruña, Culleredo, Oleiros y Cambre	Ares, Cabañas, Pontedeume, Fene, Sada, Bergondo, Pademe y Miño	Ferrol, Narón, Neda, Fene y Mugardos	Santander, Camargo, El Astillero, Marina de Cudeyo y Ribalmontán del Mar
Morfología	Gran número de islas e islotes (Illa de Arousa y Sálvora) ^a	Ensenada de San Simón, Illa de Toralla e Illas Cíes ^f	Tres islas (Tambo, Ons y Onza) ^g	-	-	-	-
Ríos (caudal medio, m ³ /s)	Umia (11,7) y Ulla (13,8) ^g	Oitabén-Verdugo (10) ^b	Lérez (21,2) ^h	Mero (6,6) ^d	Eume (16,5) y Betanzos (14,1) ⁱ	Jubia (5,51) ⁱ	Miera (8,2) ^e
Actividades principales	Cultivo de ostras y mejillones ^j (2292 bateas), Pesca ^k (puertos de Ribeira y Cambados), Industria: congelado y conserva (Ribeira), actividad náutica	Pesca ^k (puerto de Vigo, Cangas y Moaña); actividades náuticas (Vigo)	Pesca ^k (puertos de Marín, Portoovo y Bueu)	Pesca ^k (puerto A Coruña); Industria energética	Cultivo de mejillones ^j (147 bateas)	Pesca ^k (puerto de Ferrol); industria astilleros	Pesca (puerto de Santander); industria metalurgia y química ^l
EDAR (hab) ^m	A Pobra (30.000), Illa de Arousa (12.800) y Cambados (44.000)	Baiona (36.000), Vilaboa (3.032), Soutomaior (8.621 y 2.411)	Pontevedra (200.000)	A Coruña (250.000)	Betanzos (25.000), y Ares-Fene-Mugardos (52.000)		Santander (250.000) ⁿ

a. [Pérez-Fernández y cols., 2015]; b. [Montero-Vilar, 1999]; c. [Hernández-Otero y cols., 2014]; d. [Gómez-Gesteira y cols., 1999]; e. [IHC, 2011]; f. [Martín Míguez y cols., 2001]; g. [Rosón y cols., 1991]; h. [Prego y cols., 2001]; i. [Prego y cols., 1999]; j. [Galicia, 2012]; k. [Xunta-Galicia, 2012]; l. [Viguri y cols., 2002]; m. [Augas-Galicia, 2013]; n. [Cantabria, 2013]

2. RECOGIDA Y ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

2.1. Toma de muestra

Se toman un total de 98 muestras de agua en cuatro de las principales rías gallegas y en el golfo de Vizcaya: 37 muestras en la ría de Arousa (Figura 48A), 38 muestras en la ría de Vigo (Figura 48B), 11 muestras en la ría de Pontevedra (Figura 48C), 8 muestras en la ría de A Coruña (Figura 49) y 4 muestras en la bahía de Santander (Figura 50). La selección de las estaciones de muestreo se lleva a cabo teniendo en cuenta tanto zonas próximas a posibles fuentes de contaminación como zonas donde únicamente se espera contaminación de fondo.

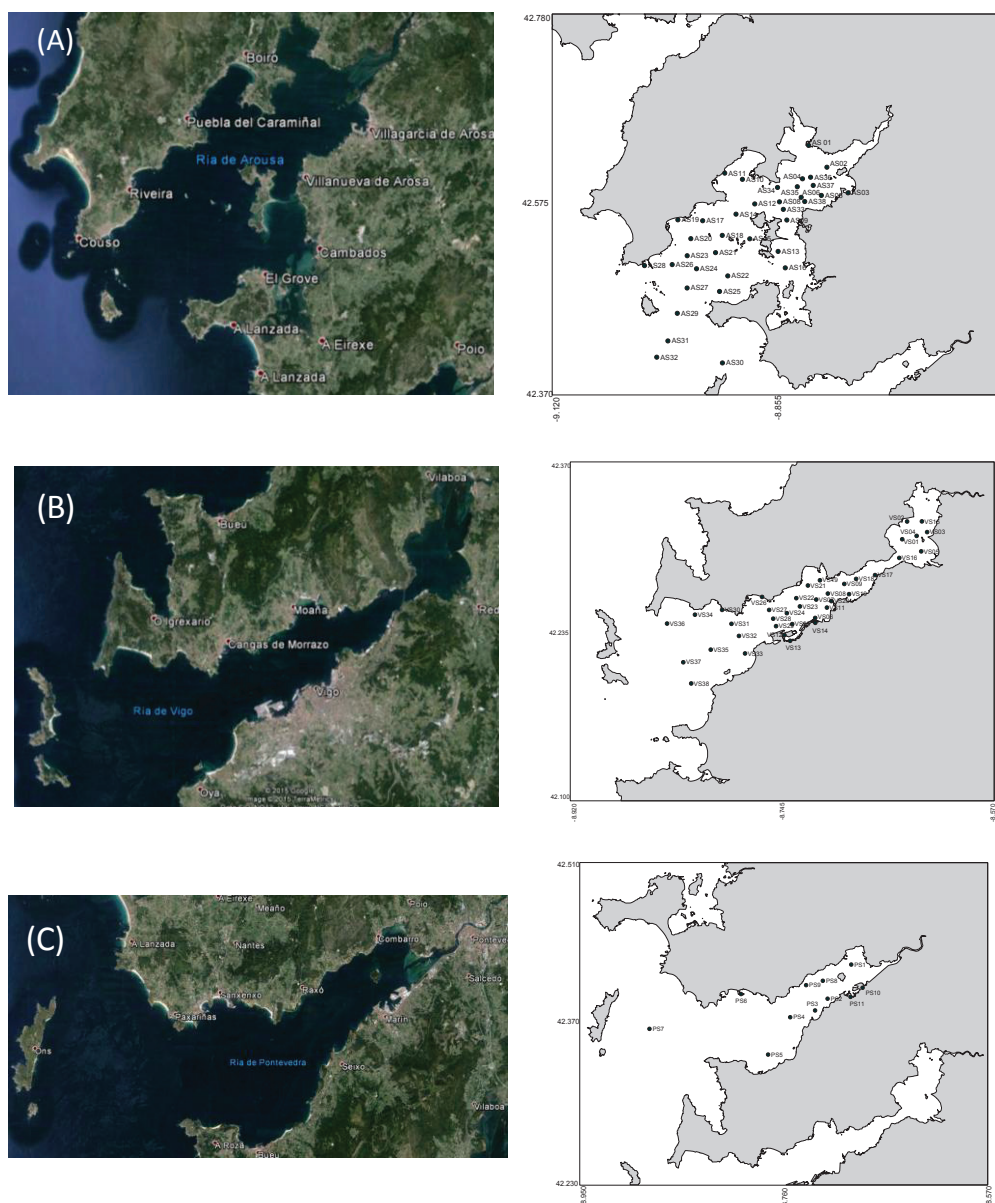


Figura 48. Localización y estaciones de muestreo en (A) ría de Arousa, (B) ría de Vigo y (C) ría de Pontevedra

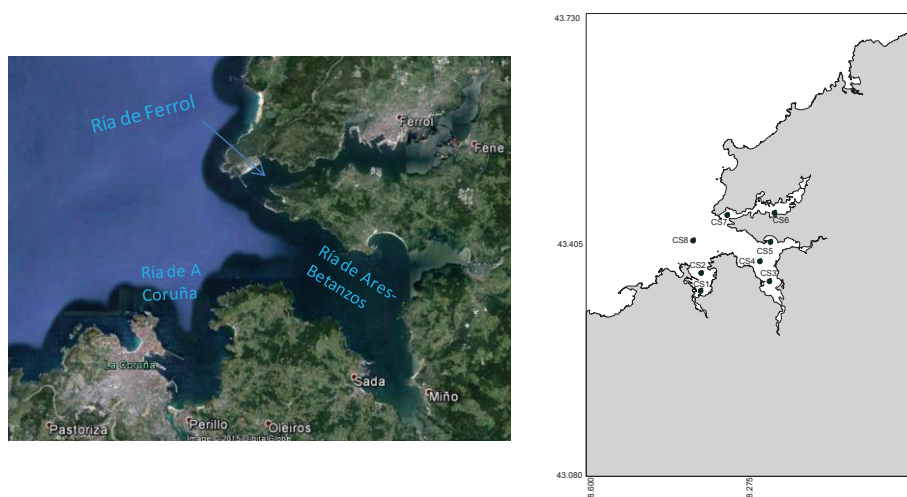


Figura 49. Ría de A Coruña (Ría de A Coruña, ría de Ares-Betanzos y ría de Ferrol). Localización y estaciones de muestreo

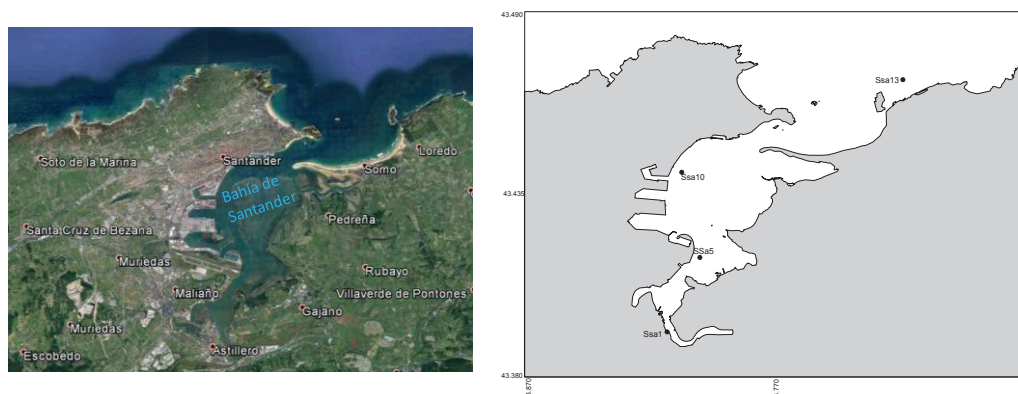


Figura 50. Bahía de Santander. Localización y estaciones de muestreo

Se realizan dos muestreos durante Mayo de 2011 (ría de Arousa y ría de Vigo) y Julio de 2012 (ría de Pontevedra, ría de A Coruña y bahía de Santander), en colaboración con el Instituto Español de Oceanografía de Vigo (IEO-Vigo), a bordo del buque oceanográfico de investigación José María Navaz. La toma de muestra se lleva a cabo a un metro de profundidad aproximadamente, utilizando botellas de vidrio de 2 L previamente lavadas. A la llegada al laboratorio las muestras se almacenan a 4°C durante un máximo de cinco días hasta su análisis.

2.2. Análisis de las muestras

Las muestras se analizan aplicando el método de microextracción líquido-líquido dispersiva seguida de la determinación por cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem (DLLME-LC-MS/MS), desarrollado en el Capítulo III (págs. 111-117). Brevemente, 30 mL de muestra se extraen con 100 µL de 1-octanol agitando durante 5 min. Tras una centrifugación (de 3 min a 3500 rpm) la

gota de 1-octanol se lleva a 1 mL de MeOH y se inyecta en el cromatógrafo de líquidos para su determinación mediante LC-MS/MS.

Para asegurar la fiabilidad de los resultados, se llevan a cabo blancos de procedimiento y muestras sobrecargadas (ensayos recuperación) en todas las series de análisis. Además, se evita el uso de material de plástico durante todo el procedimiento experimental, así como de detergentes en la limpieza del material de vidrio.

3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1. Niveles de APs y BPA en las rías gallegas y el golfo de Vizcaya

En la Tabla 31 se recoge el rango de concentraciones y los valores medios observados en las áreas muestreadas. No se determina la presencia de ninguno de los EDCs bajo estudio en la bahía de Santander (golfo de Vizcaya), por lo que la discusión de los resultados se centra en las cuatro rías gallegas.

La presencia de los isómeros lineales (4-*n*-OP y 4-*n*-NP) se observa únicamente en dos de las rías (Arousa y Vigo) a bajas concentraciones ($<0,02 \mu\text{g/L}$), mientras que la de los isómeros ramificados se encuentra en la mayoría de las estaciones de muestreo, a concentraciones entre $<0,008$ - $0,072 \mu\text{g/L}$ y $<0,030$ - $0,337 \mu\text{g/L}$ para el 4-tOP y el NP, respectivamente. Los niveles de 4-tOP superan, en algunos casos, los EQS establecidos por la Directiva 2013/39/UE [Directiva-2013/39] (AA: $0,01 \mu\text{g/L}$); sin embargo, y dado que el valor legislado es una media anual, un valor único no es suficiente para afirmar una contaminación de las aguas por 4-tOP, siendo necesario llevar a cabo nuevos muestreos o estudios más extensos que permitan establecer un valor medio de concentración comparable al del EQS. Por su parte, los niveles de NP se encuentran por debajo del EQS correspondiente (MAC: $2 \mu\text{g/L}$). El BPA se determina en tres de las rías (Vigo, Pontevedra y A Coruña) a concentraciones que varían entre $0,02$ y $0,146 \mu\text{g/L}$.

Las concentraciones de 4-tOP, NP y BPA son similares a las encontradas en Jamaica ($0,08$ - $0,42 \mu\text{g/L}$) [Ferguson *y cols.*, 2001] y Venecia ($0,026$ - $0,211 \mu\text{g/L}$) [Pojana *y cols.*, 2007] y un orden de magnitud mayores a las mostradas en la Ría de Aveiro (Portugal) ($0,001$ - $0,035 \mu\text{g/L}$) [Jonkers *y cols.*, 2010]; sin embargo, son inferiores a las recogidas en zonas altamente industrializadas y con elevado número de habitantes como Singapur ($0,04$ - $2,67 \mu\text{g/L}$) [Basheer *y cols.*, 2004]. Los niveles de estos compuestos en aguas de otras zonas geográficas se recogen en la Tabla 33 de este Capítulo (pág. 170).

Tabla 33. Rango de concentraciones, número de muestras positivas y valores medios de las muestras positivas ($\mu\text{g/L}$) de alquilfenoles y bisfenol A en cada estuario

		Ría de Arousa	Ría de Vigo	Ría de Pontevedra	Ría de A Coruña	Bahía de Santander
	Número muestras	37	38	11	8	4
4-tOP	Rango	<0,008-0,072	<0,008-0,01	<0,008	<0,008	<0,008
	Muestras positivas	14	1	0	0	0
	Media	0,03	0,01	-	-	-
4-n-OP	Rango	<0,006-0,009	<0,006	<0,006	<0,006	<0,006
	Muestras positivas	1	0	0	0	0
	Media	0,009	-	-	-	-
4-n-NP	Rango	<0,005-0,013	<0,005-0,016	<0,005	<0,005	<0,005
	Muestras positivas	5	2	0	0	0
	Media	0,084	0,012	-	-	-
NP	Rango	0,037-0,240	<0,03-0,337	<0,03-0,054	<0,03	<0,03
	Muestras positivas	37	20	1	0	0
	Media	0,084	0,103	0,054	-	-
BPA	Rango	<0,02	<0,02-0,117	<0,02-0,146	<0,02-0,083	<0,02
	Muestras positivas	0	3	2	1	0
	Media	-	0,056	0,119	0,083	-

3.2. Distribución espacial de APs y BPA y posibles fuentes de contaminación

La distribución espacial de los contaminantes, representada en la Figura 43, permite localizar las posibles fuentes de contaminación de alquilfenoles y bisfenol A. Como se ha comentado en el sub-apartado anterior, la bahía de Santander (golfo de Vizcaya) no se tiene en cuenta en la discusión de resultados debido a la ausencia de muestras positivas.

En la Ría de Arousa (Figura 51A) no se determina la presencia de BPA, mientras que los APs ramificados (4-tOP y NP) se miden en la mayoría de las muestras. Las mayores concentraciones de estos compuestos se observan en las estaciones de muestreo AS17 (0,237 $\mu\text{g/L}$ de NP), AS19 (0,130 $\mu\text{g/L}$ de NP) y AS20 (0,072 $\mu\text{g/L}$ de 4-tOP), próximas al pueblo de Ribeira (27.000 hab), donde se localizan un puerto pesquero y un club náutico de gran importancia en la zona. Los detergentes y otros productos utilizados en la limpieza de los barcos parecen ser la principal fuente de contaminación de estos compuestos [Arditsoglou y cols., 2012]. En cuanto a los isómeros lineales (4-n-OP y 4-n-NP) únicamente se detectan en la estación AS09

(<0,013 $\mu\text{g/L}$), cerca de Illa de Arousa y Vilagarcía de Arousa, lo que indica la presencia de una estación depuradora de aguas residuales (EDAR) próxima a esta zona.

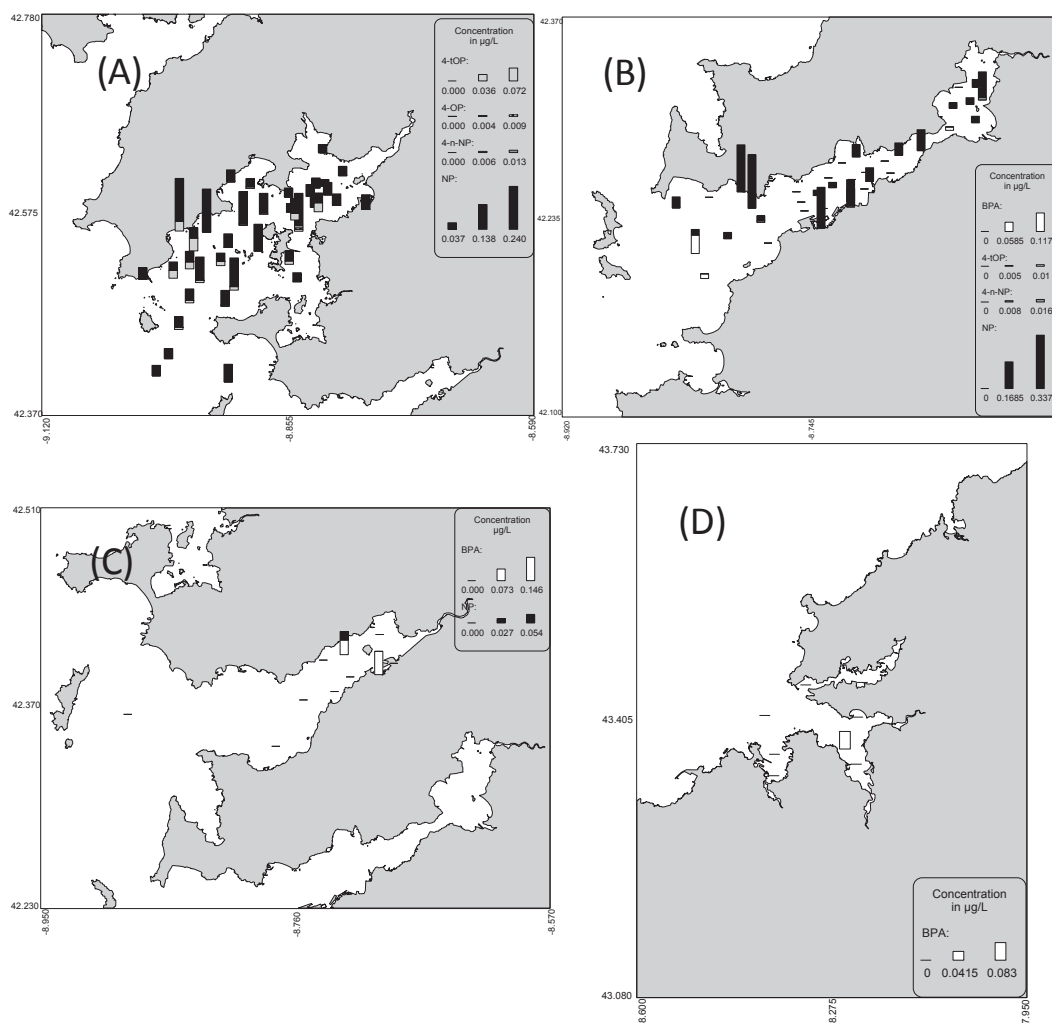


Figura 51. Niveles de concentración ($\mu\text{g/L}$) y distribución espacial de APs y BPA en las cuatro rías gallegas: (A) Ría de Arousa, (B) Ría de Vigo, (C) Ría de Pontevedra y (D) Ría de A Coruña

Sólo el 50% de las muestras tomadas en la ría de Vigo presentan APs y BPA (Figura 51B); sin embargo, la concentraciones observadas son mayores que las de la Ría de Arousa. Se determinan niveles de NP superiores a $0,1 \mu\text{g/L}$ en las estaciones VS13 ($0,258 \mu\text{g/L}$) y VS14 ($0,108 \mu\text{g/L}$), próximas al puerto y al club náutico de Vigo (300.000 hab), donde los detergentes utilizados para la limpieza de los barcos pueden ser la principal fuente de contaminación. Esta misma fuente puede ser el origen de los mayores niveles de NP medidos en las estaciones VS30 ($0,296 \mu\text{g/L}$) y VS31 ($0,337 \mu\text{g/L}$), situadas en Cangas do Morrazo, cerca del puerto pesquero. La presencia del BPA en las estaciones VS37 ($0,117 \mu\text{g/L}$) y VS38 ($0,298 \mu\text{g/L}$) próximas a Nerga y Oia (poblaciones de menos de 3.000 hab) puede ser atribuida a descargas municipales y/o industriales.

En la rías de Pontevedra y A Coruña (Figuras 51C y 51D, respectivamente) se observan concentraciones menores de todos los compuestos, siendo el BPA el contaminante predominante. Este contaminante se determina en las estaciones PS8 (0,091 µg/L) y PS11 (0,146 µg/L) de la Ría de Pontevedra, próximas a zonas de bateas y al pueblo de Marín (26.000 hab), donde los efluentes industriales pueden ser la principal fuente de contaminación. En el caso de A Coruña, el BPA sólo se encuentra en la estación de muestreo CS4 (ría Ares-Betanzos); aunque la concentración no es despreciable (0,083 µg/L), no se puede establecer ninguna fuente de contaminación por tratarse de un valor aislado.

Cabe destacar de nuevo que se trata de un estudio preliminar sobre la presencia de APs y BPA en la costa y sus posibles fuentes de contaminación, por lo que se requieren más investigaciones que confirmen las fuentes antes mencionadas.

3.3. Evaluación del impacto ecológico: cocientes de peligrosidad (*risk quotient*)

Las guías técnicas de la Unión Europea sugieren el empleo del cociente de peligrosidad (RQ) para evaluar el riesgo ecológico que un contaminante supone para el medioambiente [WorkingParty-EU-1994]. Se calcula como el cociente entre la máxima concentración ambiental de un contaminante (MEC) y la concentración a la cual ese contaminante no produce efectos en una determinada especie (PNEC). Cuando el valor de RQ está por debajo de 0,1 se considera que el riesgo ecológico es bajo; si está entre 0,1 y 1 moderado, y si es mayor que 1 el riesgo es alto [Blair y cols., 2013].

En esta memoria, los RQ se calculan utilizando como MEC las concentraciones máximas de cada compuesto en las aguas de las distintas rías y como valores de PNEC los publicados en diferentes documentos de la Unión Europea, en los cuales se considera la especie más sensible a cada contaminante en un ecosistema dado: 0,15 µg/L para BPA (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) [European-Commission, 2002]; 0,122 µg/L para el 4-tOP (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) [European-Commission, 2005a], y 0,33 µg/L para NP (*Scenedesmus subspicatus* Chodat, 1926) [European-Commission, 2005b]. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 52.

Se observa un riesgo bajo o moderado en la mayoría de los casos estudiados, excepto en la Ría de Vigo (estación de muestreo VS31, Cangas do Morrazo) para el NP y en la Ría de Pontevedra (estación de muestreo PS11, Marín) para el BPA donde el cociente de peligrosidad se aproxima a la unidad (riesgo alto). El alto valor de RQ obtenido puede ser atribuido a las descargas industriales y a las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) situadas en esas zonas.

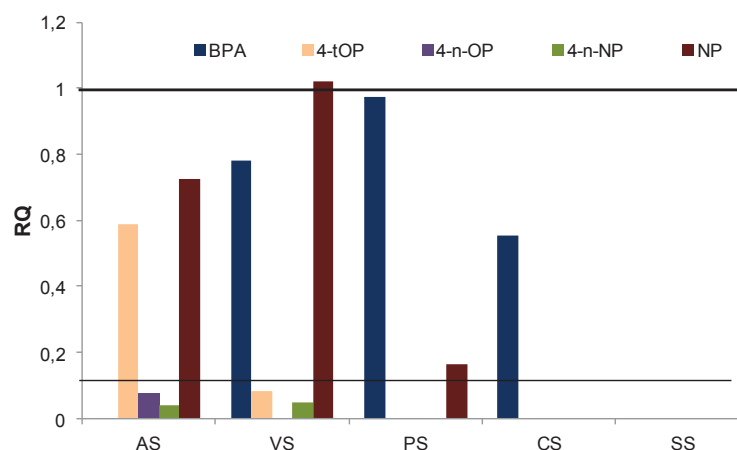


Figura 52. Cociente de peligrosidad (RQ) de las zonas bajo estudio en base a la concentración máxima de cada contaminante: AS (Ría de Arousa), VS (Ría de Vigo), PS (Ría de Pontevedra), CS (Ría A Coruña) y SS (Bahía de Santander)

3.4. Estimación del nivel de exposición de seres vivos a EDCs en el área bajo estudio

3.4.1. Efectos en la fauna acuática

Dado que pueden existir interacciones entre los efectos (sinergismo/antagonismo) que los distintos contaminantes presentes en un ecosistema producen en el sistema celular de los seres vivos [Rudel *y cols.*, 2003], se suelen considerar “mezclas de contaminantes” cuando se llevan a cabo evaluaciones de riesgo. En esta memoria se evalúan los posibles efectos de alteración endocrina que pueden provocar las concentraciones observadas de alquifenoles y bisfenol A en la fauna acuática de las rías, mediante la estimación de la actividad estrogénica de las aguas.

Generalmente la actividad estrogénica se estima en términos de equivalentes de estradiol (EEQ), calculados de acuerdo con las siguientes ecuaciones:

$$EEQ_i = C_i \times EEF_i$$

$$EEQ_t = \sum EEQ_i$$

donde EEQ_i y EEQ_t son los equivalente de estradiol de un compuesto i y del total de compuestos t , respectivamente; C_i es la concentración del compuesto i en el medio y EEF es el factor de equivalencia de estradiol. Por su parte, los EEF se definen como el cociente entre el valor de EC_{50} de un compuesto con respecto al valor de EC_{50} del 17-*beta*-estradiol (siendo EC_{50} la concentración a la cual se observan efectos en el 50% de la población). Los valores de EEF utilizados en este estudio, determinados mediante ensayos in vitro de ER-CALUX [de Voogt *y cols.*, 2003; Zhang *y cols.*, 2014], se muestran en la Tabla 34.

Los equivalentes totales de estradiol, EEQ_t , se calculan para cada ría gallega teniendo en cuenta la media de todas las muestras positivas (Tabla 34). Las rías de A Coruña y Pontevedra muestran bajos valores de actividad estrogénica (inferiores a 0,017 ng/L), siendo el BPA el mayor contribuyente de esta actividad con un 100% y un 73%, respectivamente. Por otra parte, en las rías de Arousa y Vigo se observan valores seis veces mayores (superiores a 0,066 ng/L); en este caso es el NP el EDC que más contribuye, con más de un 95% en ambos casos.

Tabla 34. Factores de equivalencia de estradiol (EEF), equivalentes de estradiol (EEQ_i) y contribución de cada compuesto a la actividad estrogénica de la muestra (%)

Compuesto	EEF	Ría de Arousa		Ría de Vigo		Ría de Pontevedra		Ría de A Coruña	
		EEQ_i	%	EEQ_i	%	EEQ_i	%	EEQ_i	%
4-tOP	1,9E-005 ^a	5,1E-005	0,07	3,3E-006	-	-	-	-	-
4-n-OP	4,5E-006 ^a	-	-	-	-	-	-	-	-
4-n-NP	1,8E-007 ^a	-	-	1,9E-007	-	-	-	-	-
NP	9,0E-004 ^b	7,5E-002	99,92	6,5E-002	95,6	4,8E-006	27	-	-
BPA	6,0E-004 ^b	-	-	3,3E-003	4,3	1,3E-005	73	6,3E-003	100
EEQ_t (ng/L)		0,076		0,066		0,017		0,006	

^a [Zhang y cols., 2011] ^b [de Voogt y cols., 2003]

Estudios ecotoxicológicos han demostrado un incremento en la producción de los niveles de *vitellogenin* en el plasma de los peces a valores de EEQ_t entre 2,5 y 10 ng/L, mientras que concentraciones entre 10 y 100 ng/L inhiben el crecimiento testicular. En cualquier caso, los valores observados en este estudio son tres órdenes de magnitud inferiores a los mencionados, por lo que no se esperan efectos de alteración endocrina en la fauna acuática de las rías gallegas consideradas en esta memoria.

3.4.2. Efectos en la salud humana

Como una primera aproximación, se evalúa el impacto que la ingesta de organismos acuáticos de las zonas bajo estudio provoca en la salud humana. Para ello se calcula la ingesta diaria de alquilfenoles y bisfenol A en pescados y mejillones, seleccionados como alimentos procedentes del mar representativos de Galicia e incluidos en la dieta de los gallegos.

Partiendo de los niveles de los EDCs observados en las aguas analizadas, se estima la concentración de estos compuestos en peces y mejillones, mediante factores de bioconcentración (BCF). El BCF se define como el cociente (en L/Kg de tejido) de la concentración de un compuesto en un organismo acuático y su concentración en

agua, en situaciones en las que el organismo está únicamente expuesto al contaminante a través del agua [USEPA-2000], de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$C_{\text{organismos}} = \text{BCF} \times C_{\text{agua}}$$

donde $C_{\text{organismos}}$ es la concentración en el organismo bajo estudio (en este caso peces y mejillones) y C_{agua} es la concentración media de agua calculada considerando todas las muestras. En aquellas en las que la concentración es menor que el MQL, se utiliza la mitad del valor del MQL para el cálculo, de acuerdo con la Directiva 2009/90/CE [Directiva-2009/90]. Los BCF utilizados en este trabajo, recogidos en la bibliografía, varían entre 68 y 1248 L/Kg para peces [European-Commission, 2005a, b; Flint *y cols.*, 2012] y entre 144 y 3000 L/Kg para mejillones [Arditsoglou *y cols.*, 2012; European-Commission, 2005a; Flint *y cols.*, 2012]. Las concentraciones estimadas de APs y BPA en peces y mejillones, calculadas para las cuatro rías gallegas, son inferiores a 4 ng/g para todos los compuestos excepto para el NP, en la que se alcanzan concentraciones de entre 23,1 y 106 ng/g en peces y 55,6 y 256 ng/g en mejillones, correspondiéndose los valores más elevados con la ría de Arousa.

Seguidamente se estima la ingesta diaria (DI), de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{DI} = \frac{\text{Cantidad de mejillón consumida por persona y día, } \mu\text{g/d}}{\text{Concentración contaminante presente en mejillón, ng/g}}$$

Los valores de consumo diario se exportan de la base de datos de la EFSA [EFSA, 2011], que considera los hábitos alimentarios de las personas de distintos países europeos, incluido España. En este estudio se consideran niños, adolescentes y adultos, cuyo consumo diario oscila entre 45 y 100 g/d de pescado y entre 20 y 40 g/d de moluscos.

Los valores de DI obtenidos para pescado son inferiores a 2 $\mu\text{g/d}$ para todos los compuestos, excepto para el NP que supera los 5 $\mu\text{g/d}$ (ría de Arousa). En el caso de los mejillones, los valores de 4-tOP, 4-n-OP, 4-n-NP y BPA son similares a los de pescado (2 $\mu\text{g/d}$), pero los de NP oscilan entre 2 y 11 $\mu\text{g/d}$; de nuevo el valor más alto se corresponde con la ría de Arousa. A pesar de que el consumo de pescado es casi el doble que el de mejillón, el valor de ingesta diaria es menor, debido a la menor concentración de los compuestos en los peces, cuya capacidad de bioacumulación es menor (BCFs menores en peces).

Estos valores son de uno a tres órdenes de magnitud menores que los niveles de ingesta diaria tolerable (TDI) propuestos por distintos organismos, como el Instituto de Seguridad y Toxicología de Dinamarca (0,3 mg/adulto/d para NP y 0,6 $\mu\text{g/adulto/d}$ para 4-tOP [Ferrara *y cols.*, 2008] o la EFSA (0,05 mg/adulto/d para BPA) [EFSA, 2013]. A la vista de los resultados, no se espera riesgo para la salud humana por la ingestión de pescado y mejillones de las rías gallegas; sin embargo, otras vías de exposición como la inhalación o el contacto dérmico deben ser también

evaluadas para establecer conclusiones más rigurosas acerca del riesgo que estos compuestos suponen para la salud pública.

4. CONCLUSIONES

Se ha determinado la presencia y distribución espacial de alquilfenoles y bisfenol A en cuatro rías gallegas (Arousa, Vigo, Pontevedra y A Coruña) y el golfo de Vizcaya (Bahía de Santander). El NP ha sido el compuesto más ubicuo, encontrándose en más del 60% de las muestras y alcanzando una concentración máxima de 0,337 $\mu\text{g/L}$ en la Ría de Vigo (estación de muestreo VS31, Cangas do Morrazo). El 4-tOP se ha determinado a concentraciones menores a 0,072 $\mu\text{g/L}$ en el 18% de las muestras. La presencia de los isómeros lineales ha sido observada en menos de un 7% de las muestras a niveles inferiores a 0,016 $\mu\text{g/L}$ y a 0,009 $\mu\text{g/L}$ para el 4-*n*-NP y el 4-*n*-OP, respectivamente. El 6% de las muestras han sido positivas en BPA, midiéndose principalmente en la ría de Pontevedra y A Coruña a concentraciones menores a 0,146 $\mu\text{g/L}$. Los valores de EQS establecidos por la Directiva 2013/39/UE para el NP (máxima concentración admisible: 2 $\mu\text{g/L}$) no se han alcanzado en ninguna estación de muestreo, mientras que los del 4-tOP (media anual: 0,01 $\mu\text{g/L}$ para otras aguas superficiales) se han superado en todas las muestras positivas para este compuesto. Dado que se trata de una media anual, con un dato único no se puede afirmar que exista contaminación por 4-tOP en las rías gallegas; sin embargo, sería conveniente realizar nuevos muestreos en la zona para estimar un valor de concentración medio anual, pudiendo así evaluar la calidad del medio acuático con mayor certeza.

La distribución espacial de los EDCs bajo estudio ha indicado que las principales fuentes de contaminación son las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR), las zonas portuarias y clubs náuticos (relacionado con los detergentes usados en la limpieza de los barcos), y los efluentes industriales (especialmente en el caso del BPA).

Se ha evaluado el cociente de peligrosidad (RQ) para las rías gallegas y la bahía de Santander, y se ha obtenido un riesgo bajo o moderado en la mayoría de los casos, a excepción de dos estaciones situados en la Ría de Vigo (VS31, Cangas do Morrazo) y la Ría de Pontevedra (PS11, Marín), en base a los niveles de NP y BPA, respectivamente. Para estos casos sería interesante realizar nuevos estudios que confirmen los resultados obtenidos en esta memoria y que controlen su variación a lo largo del tiempo.

Finalmente, y como una primera aproximación, se han valorado los efectos que los niveles de APs y BPA medidos en aguas tendrían sobre la fauna acuática de la zona y sobre la salud pública por ingestión de pescados y mejillones, estimando la actividad estrogénica de las aguas y el *daily intake*, respectivamente. Los valores de EEQs obtenidos no inducen efectos biológicos en los organismos, y la ingestión de organismos no supone un riesgo para la salud pública.

Es de destacar que se trata de estudios preliminares sobre la presencia y el riesgo para el medio ambiente y la salud humana asociado a estos compuestos por ingestión, por lo que son necesarios estudios más extensos que apoyen estas hipótesis. Sin embargo, los resultados obtenidos demuestran el interés del análisis de estos compuestos en las rías gallegas, pues su presencia está asociada con las actividades principales de estas zonas, como la acuicultura, la pesca, la navegación deportiva o las industrias afines.

Bibliografía

- Arditsoglou, A., Voutsas, D. *Occurrence and partitioning of endocrine-disrupting compounds in the marine environment of Thermaikos Gulf, Northern Aegean Sea, Greece*, Mar Pollut Bull (2012) 64, 2443-2452.
- Augas-Galicia, Xunta de Galicia, Consellería de Medio Ambiente, territorio e infraestrutura (2013). <http://augas.cmati.xunta.es>
- Basheer, C., Lee, H.K. *Analysis of endocrine disrupting alkylphenols, chlorophenols and bisphenol A using hollow fiber-protected liquid-phase microextraction coupled with injection port-derivatization gas chromatography-mass spectrometry*, J Chromatogr A (2004) 1057, 163-169.
- Blair, B.D., Crago, J.P., Hedman, C.J., Klaper, R.D. *Pharmaceuticals and personal care products found in the Great Lakes above concentrations of environmental concern*, Chemosphere (2013) 93, 2116-2123.
- Cantabria, Gobierno de Cantabria, Medio Ambiente, Agua, Residuos y Energía de Cantabria, S.A. (2013). www.mare.es
- de Voogt, P., van Hattum, B. *Critical factors in exposure modeling of endocrine active substances*, Pure Appl Chem (2003) 75, 1933-1948.
- Directiva 2008/56/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 17 de junio de 2008 por la que se establece un marco de acción comunitaria para la política del medio marino (Directiva Marco sobre la Estrategia Marina). DOUE, L 164/19.
- Directiva 2009/90/CE de la Comisión del 31 de julio de 2009 por la que se establecen, de conformidad con la Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, las especificaciones técnicas del análisis químico y del seguimiento del estado de las aguas. DOUE, L 201/36.
- Directiva 2013/39/UE del Parlamento Europeo y del Consejo de 12 de agosto de 2013 por la que se modifican las Directivas 2000/60/CE y 2008/105/CE en cuanto a las sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas. DOUE, L 226/1.
- EFSA, European Food Safety Authority (2011). *Comprehensive Food Consumption Database*
- EFSA, European Food Safety Authority (2013). <http://www.efsa.europa.eu/en/faqs/faqchemicalsinfood.htm>

- Common Implementation Strategy for the Water Framework Directive. Environmental Quality Standards, Substance Data sheet (25): octylphenol (para-tert-octylphenol), 2005.
- Common Implementation Strategy for the Water Framework Directive. Environmental Quality Standards (EQS). Substance Data sheet (24): Nonylphenols and 4-Nonylphenol, 2005.
- Updated European union risk assessment report 4,4'-Isopropylidenediphenol (bisphenolA). EUR 24588EN.
- Ferguson, P.L., Iden, C.R., Brownawell, B.J. *Distribution and fate of neutral alkylphenol ethoxylate metabolites in a sewage-impacted urban estuary*, Environ Sci Technol (2001) 35, 2428-2435.
- Ferrara, F., Ademollo, N., Delise, M., Fabietti, F., Funari, E. *Alkylphenols and their ethoxylates in seafood from the Tyrrhenian Sea*, Chemosphere (2008) 72, 1279-1285.
- Flint, S., Markle, T., Thompson, S., Wallace, E. *Bisphenol A exposure, effects, and policy: A wildlife perspective*, J Environ Manag (2012) 104, 19-34.
- Galicia, Consejo Regulador de la Denominación de Origen Protegida Mexillón de Galicia (2012). <http://www.mexillondegalia.org/>
- Gomez-Gesteira, M., Montero, P., Prego, R., Taboada, J.J., Leitao, P., Ruiz-Villarreal, M., Neves, R., Pérez-Villar, V. *A two-dimensional particle tracking model for pollution dispersion in A Coruna and Vigo Rias (NW Spain)* Oceanol Acta (1999) 22, 167-177.
- Hernández-Otero, A., Gaspar, M.B., Macho, G., Vázquez, E. *Age and growth of the sword razor clam *Ensis ascutatus* in the Ría de Pontevedra (NW Spain): influence of environmental parameters*, J Sea Res (2014) 85, 59-72.
- IHC, Instituto Hidráulico Ambiental de Cantabria (2011). <http://www.ihcantabria.com/es/>
- Iparraguirre, A., Navarro, P., Prieto, A., Rodil, R., Olivares, M., Fernández, L.-A., Zuloaga, O. *Membrane-assisted solvent extraction coupled to large volume injection-gas chromatography-mass spectrometry for the determination of a variety of endocrine disrupting compounds in environmental water samples*, Anal Bioanal Chem (2012) 402, 2897-2907.
- Jonkers, N., Laane, R., de Graaf, C., de Voogt, P. *Fate modeling of nonylphenol ethoxylates and their metabolites in the Dutch Scheldt and Rhine estuaries: validation with new field data*, Estuar Coast Shelf Sci (2005) 62, 141-160.
- Jonkers, N., Sousa, A., Galante-Oliveira, S., Barroso, C., Kohler, H., Giger, W. *Occurrence and sources of selected phenolic compounds disruptors in Ria de Aveiro, Portugal*, Environ Sci Pollut Res (2010) 17, 834-843.
- Li, D., Dong, M., Shim, W.J., Yim, U.H., Hong, S.H., Kannan, N. *Distribution characteristics of nonylphenolic chemicals in Masan Bay environments, Korea*, Chemosphere (2008) 71, 1162-1172.
- Li, J., Fu, J., Zhang, H., Li, Z., Ma, Y., Wu, M., Liu, X. *Spatial and seasonal variations of occurrences and concentrations of endocrine disrupting chemicals in unconfined and*

confined aquifers recharged by reclaimed water: A field study along the Chaobai River, Beijing, Sci Total Environ (2013) 450, 162-168.

Lisboa, N.S., Fahning, C.S., Cotrim, G., Dos Anjos, J.P., de Andrade, J.B., Hatje, V., da Rocha, G.O. *A simple and sensitive UFLC-fluorescence method for endocrine disrupters determination in marine waters*, Talanta (2013) 117, 168-75.

MAGRAMA, Ministerio de Agricultura y Medio Ambiente (2012). <http://www.magrama.gob.es/>

Martín Míguez, B., Fariña Busto, L., Figueiras, F.G., Pérez, F.F. *Succession of phytoplankton assemblages in relation to estuarine hydrodynamics in the Ría de Vigo: a box-model approach*, Scientia Marina (2001) 65-76.

Montero-Vilar, P., *Estudio de la hidrodinámica de la Ría de Vigo mediante un modelo de volúmenes finitos* Universidade de Santiago de Compostela (1999).

Munaron, D., Tapie, N., Budzinski, H., Andral, B., González, J.-L. *Pharmaceuticals, alkylphenols and pesticides in Mediterranean coastal waters: Results from a pilot survey using passive samplers*, Estuar Coast Shelf Sci (2012) 114, 82-92.

Pérez-Fernández, B., Viñas, L., Franco, M., Bargiela, J. *PAHs in the Ría de Arousa (NW Spain): A consideration of PAHs sources and abundance.*, Mar Pollut Bull (2015) 95, 155-165.

Petrovic, M., Barceló, D. *Determination of phenolic xenoestrogens in environmental samples by liquid chromatography with mass spectrometric detection*, J AOAC Int (2001) 84, 1074-1085.

Pojana, G., Gomiero, A., Jonkers, N., Marcomini, A. *Natural and synthetic endocrine disrupting compounds (EDCs) in water, sediment and biota of a coastal lagoon*, Environ Int (2007) 33, 929.

Prego, R., Barciela, C., Varela, M. *Nutrient dynamics in the Galician coastal area (northwestern Iberian Peninsula): do the Rias Bajas receive more nutrient salts than the Rias Altas?*, Cont Shelf Res (1999) 19, 317-334.

Prego, R., Dale, A.W., de Castro, M., Gómez-Gesteira, M., Taboada, J., Montero, P., Villareal, M.R., Pérez-Villar, V. *Hydrography of the Pontevedra Ria: Intra-annual spatial and temporal variability in a Galician coastal upwelling system (NW Spain)*, J Geophys Res (2001) 106, 19845-19858.

Quelle, C., Besada, V., Andrade, J.M., Gutiérrez, N., Schultze, F., Gago, J., González, J.J. *Chemometric tools to evaluate the spatial distribution of trace metals in surface sediments of two Spanish rias*, Talanta (2011) 87, 197-209.

Rosón, G., Pérez, F.F., Alvarez-Salgado, X.A., Ríos, A.F. *Flujos de los aportes de agua continental a la Ría de Arosa*, Sci Mar (1991) 55, 583-589.

Rudel, R.A., Camann, D.E., Spengler, J.D., Korn, L.R., Brody, J.G. *Phthalates, alkylphenols, pesticides, polybrominated diphenyl ethers, and other endocrine-disrupting compounds in indoor air and dust*, Environ Sci Technol (2003) 37, 4543-4553.

Salgueiro-González, N., Concha-Graña, E., Turnes-Carou, I., Muniategui-Lorenzo, S., López-Mahía, P., Prada-Rodríguez, D. *Determination of alkylphenols and*

- bisphenol A in seawater samples by dispersive liquid-liquid microextraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry for compliance with Environmental Quality Standards (Directive 2008/105/EC)*, J Chromatogr A (2012) 1223, 1-8.
- Sánchez-Avila, J., Fernández-Sanjuan, M., Vicente, J., Lacorte, S. *Development of a multi-residue method for the determination of organic micropollutants in water, sediment and mussels using gas chromatography-tandem mass spectrometry*, J Chromatogr A (2011) 1218, 6799.
- Sánchez-Avila, J., Vicente, J., Echavarri-Erasun, B., Porte, C., Tauler, R., Lacorte, S. *Sources, fluxes and risk of organic micropollutants to the Cantabrian Sea (Spain)*, Mar Pollut Bull (2013) 72, 119-132.
- Staniszewska, M., Falkowska, L., Grabowski, P., Kwasniak, J., Mudrak-Cegiolka, S., Reindl, A.R., Sokolowski, A., Szumilo, E., Zgrundo, A. *Bisphenol A, 4-tert-Octylphenol, and 4-Nonylphenol in The Gulf of Gdansk (Southern Baltic)*, Arch Environ Contam Toxicol (2014) 67, 335-347.
- Methodology for Deriving Ambient Water Quality Criteria for the Protection of Human Health.
- Vidal-Liñán, L., Bellas, J., Salgueiro-González, N., Muniategui, S., Beiras, R. *Bioaccumulation of 4-nonylphenol and effects on biomarkers, acetylcholinesterase, glutathione-S-transferase and glutathione peroxidase, in Mytilus galloprovincialis mussel gills, Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)* (2015) 200, 133-9.
- Viguri, J., Verde, J., Irabien, A. *Environmental assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in surface sediments of the Santander Bay, Northern Spain*, Chemosphere (2002) 48, 157-165.
- EU ad Hoc Working Party, III/5504/94. Draft 4. Assessment of potential risks to the environment posed by medicinal products for human use, excluding products containing live genetically modified organisms.
- Xunta-Galicia, Xunta de Galicia, Consellería do medio rural e do mar (2012). <http://www.medioruralemar.xunta.es/>
- Zhang, X., Gao, Y., Li, Q., Li, G., Guo, Q., Yan, C. *Estrogenic Compounds and Estrogenicity in Surface Water, Sediments, and Organisms from Yundang Lagoon in Xiamen, China*, Arch Environ Contam Toxicol (2011) 61, 93.
- Zhang, Z., Ren, N., Kannan, K., Nan, J., Liu, L., Ma, W., Qi, H., Li, Y. *Occurrence of Endocrine-Disrupting Phenols and Estrogens in Water and Sediment of the Songhua River, Northeastern China*, Arch Environ Contam Toxicol (2014) 66, 361-369.

CAPÍTULO VII. Impacto de alquilfenoles y bisfenol A en el río Miño



- *Implementación de la WFD en el río Miño. Distribución de alquilfenoles y bisfenol A en aguas, sedimento y biota*
- *Niveles en agua por debajo de las Normas de Calidad Ambiental establecidas por la Directiva 2013/39/UE para APs: “Buen estado químico”*
- *Bajos niveles de EDCs en sedimento y biota, excepto para el NP debido a su mayor afinidad por los sedimentos y a su alto poder de bioacumulación*

Publicaciones científicas

“Occurrence, distribution and bioaccumulation of endocrine disrupting compounds in water, sediment and biota samples from a European river basin”. N. Salgueiro-González, I. Turnes-Carou, V. Besada, S. Muniategui-Lorenzo, P. López-Mahía, D. Prada-Rodríguez. *Sci Total Environ*, (2015) 529, 121-130. Anexo VIII (págs. 363 - 386)

La ubiquidad de los alquilfenoles y el bisfenol A en el medio acuático se ha demostrado en diferentes estudios a lo largo de los últimos años. Aunque estos compuestos se han analizado en diferentes matrices ambientales como aguas, sedimentos o biota, existen pocos trabajos que estudien su presencia en más de un compartimento simultáneamente. Si se consideran las aguas, sedimentos y la fauna acuática de una zona se puede obtener información valiosa sobre la distribución, acumulación y biomagnificación de los contaminantes bajo estudio, así como conocer las principales rutas de exposición en el ecosistema. Además, de esta manera se puede evaluar la calidad del medio acuático desde un punto de vista químico (contando con información complementaria) y ecológico (al considerarse la fauna acuática), de acuerdo con la Directiva 2013/39/UE [Directiva-2013/39].

Con el fin de evaluar el estado ecológico y químico de la cuenca hidrográfica del río Miño e implementar así la Directiva Marco de Agua (WFD) (entre otros objetivos) nace el proyecto de investigación “*Transferencia de herramientas para la Evaluación, Ordenación, Gestión y Educación Ambiental en Estuarios*” (0543_TEAM_MINO_1_E) [Team-Miño, 2011], en el que se engloba el estudio de alquilfenoles y bisfenol A en el Baixo Miño. Este proyecto ha sido financiado por la Unión Europea, el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) y el Programa de Cooperación Transfronteriza España-Portugal (POCTEP, 2007-2013) y liderado por la Universidade de Vigo; sin embargo, en su desarrollo han participado, entre otros grupos y/o instituciones como el grupo de Química Analítica Aplicada (QANAP, UDC) y el Instituto Español de Oceanografía de Vigo (IEO-Vigo).

En este Capítulo se estudia la presencia, distribución y bioacumulación de los alquilfenoles y bisfenol A en el río Miño; para ello se analizan muestras de agua, sedimento y almeja asiática (*Corbicula fluminea*, Müller, 1774) tomadas durante Mayo y Noviembre de 2012 en distintas zonas del río. Se identifican también las posibles fuentes de contaminación de estos compuestos, con el fin de conocer su vía de entrada en el ecosistema, información importante para la implementación de la WFD y/o de medidas de seguimiento o control en el caso de ser necesarias. Además, como una primera aproximación a la evaluación de riesgos, se determina el impacto que estos EDCs generan en el medio ambiente y en la salud humana. Finalmente, mencionar que los resultados de este estudio son de gran interés por varios motivos: (i) no existen investigaciones previas sobre la presencia de estos compuestos en el río Miño, (ii) su distribución en este ecosistema puede ser utilizada para interpretar datos de otras cuencas hidrográficas similares y (iii) aportan información para el establecimiento de los EQS de estos compuestos en sedimentos y biota (no disponibles por el momento para estos compuestos por falta de datos científicos).

1. INTRODUCCIÓN

La Directiva Marco de Agua (WFD) [Directiva-2000/60] establece unas directrices a seguir para alcanzar un buen estado ecológico y químico de las aguas antes del año 2020. Dentro de los parámetros químicos a tener en cuenta para evaluar la calidad ambiental del medio acuático destaca el estudio de sustancias peligrosas, como los alquilfenoles (considerados como sustancias prioritarias en la Directiva 2013/39/UE [Directiva-2013/39]) y el bisfenol A.

La presencia de estos contaminantes en el medio ambiente se ha registrado en distintas regiones del mundo. A continuación se muestran algunos trabajos encontrados en la bibliografía (Web of Science™ de 2001 a 2015) en los que se recogen niveles de APs y BPA en aguas superficiales (Tabla 35), sedimento (Tabla 36) y biota (Tabla 37). Dado que no se han encontrado estudios previos que consideren la especie *Corbicula fluminea* (Müller, 1774), se incluyen otras especies de bivalvos.

Tabla 35. Niveles de alquilfenoles y bisfenol A en aguas superficiales en µg/L (2006-2015, Web of Science™). NA=no analizado

Zona bajo estudio	Concentración (µg/L)					Ref
	4-tOP	4-n-OP	4-n-NP	NP	BPA	
Río Ter (España)	<0,06-0,24	NA	NA	<0,07-5,67	<0,05-1,51	(1)
Lago Venecia (Italia)	NA	NA	NA	<0,211	<0,136	(2)
Bahía Masan (Corea)	NA	NA	NA	0,023-0,928	NA	(3)
Río Llobregat (España)	<0,88	NA	NA	0,02-0,53	NA	(4)
Lagos Sri Lanka	NA	NA	NA	0,03-1,835	NA	(5)
Río Ibaizabal (España)	<0,392	<0,237	NA	<0,196-1,379	<MQL-0,129	(6)
Río Duero (P. Ibérica)	0,022-0,024	<0,014	<0,012	NA	0,034-0,060	(7)
Río Daliao (China)	NA	NA	NA	0,083-0,777	NA	(8)
22 ríos China	0,002-0,073	NA	<0,057	NA	0,035-1,081	(9)
Bahía San Francisco (EEUU)	NA	NA	NA	<MQL-0,073	NA	(10)
Río Songhua (China)	0,0015-0,046	NA	<0,0037	0,106-0,344	0,008-0,263	(11)
Río Mondego (Portugal)	0,03-2,750	<1,279	<2,770	0,081-1,003	0,0085-0,182	(12)
4 ríos Península Ibérica	<MQL-0,085	NA	NA	<MQL-0,391	<MQL-0,649	(13)

(1) [Céspedes y cols., 2006]; (2) [Pojana y cols., 2007]; (3) [Li y cols., 2008]; (4) [Brix y cols., 2010]; (5) [Guruge y cols., 2011]; (6) [Iparraguirre y cols., 2012]; (7) [Rocha y cols., 2012]; (8) [Li y cols., 2013]; (9) [Wang y cols., 2013]; (10) [Wang y cols., 2013]; (11) [Zhang y cols., 2014]; (12) [Rocha y cols., 2014]; (13) [Gorga y cols., 2015]

Tabla 36. Niveles de alquilfenoles y bisphenol A en sedimentos en ng/g dw (2002-2015, Web of Science™).
NA=no analizado

Zona bajo estudio	Concentración (ng/g)					Ref
	4-tOP	4-n-OP	4-n-NP	NP	BPA	
Cataluña (España)	NA	NA	NA	10-1050	NA	(1)
Río Cuyahoga (EEUU)	NA	NA	NA	75-340	NA	(2)
Ríos de Corea	NA	NA	NA	10,4-5054	NA	(3)
Ríos Dutch (Alemania)	NA	NA	NA	<0,4-1080	NA	(4)
Sur de California (EEUU)	<MQL-8,2	NA	NA	122-3200	NA	(5)
Sur de China	1-18	NA	NA	60-571	NA	(6)
Yeongil (Corea)	1-24	NA	NA	3-1430	<1-191	(7)
Grandes Lagos (Canadá)	<MQL-52	NA	NA	<MQL-1750	NA	(8)
Lagos Venecia (Italia)	NA	NA	NA	47-200	2-118	(9)
Bahía Masan, Corea	NA	NA	NA	130-2810	NA	(10)
Río Llobregat (España)	<MQL-3	NA	NA	2-79	NA	(11)
Anzali (Iran)	10-1260	NA	NA	50-29000	10-6970	(12)
Río Daliao (China)	NA	NA	NA	1,5-456	NA	(13)
San Francisco (EEUU)	NA	NA	NA	21,5-86,3	NA	(14)
Río Songhua (China)	<0,0017	NA	<0,0025	0,011-0,117	<0,017	(15)
4 ríos Península Ibérica	<MQL-76	NA	NA	<MQL-1693	<MQL-117	(16)

(1) [Petrovic *y cols.*, 2002]; (2) [Rice *y cols.*, 2003]; (3) [Li *y cols.*, 2003]; (4) [Jonkers *y cols.*, 2005]; (5) [Schlenk *y cols.*, 2005]; (6) [Cheng *y cols.*, 2005]; (7) [Koh *y cols.*, 2006]; (8) [Mayer *y cols.*, 2007]; (9) [Pojana *y cols.*, 2007]; (10) [Li *y cols.*, 2008]; (11) [Brix *y cols.*, 2010]; (12) [Mortazavi *y cols.*, 2012]; (13) [Li *y cols.*, 2013]; (14) [Klosterhaus *y cols.*, 2013]; (15) [Zhang *y cols.*, 2014]; (16) [Gorga *y cols.*, 2015]

Tabla 37. Niveles de alquifenoles y bisphenol A en biota en ng/g dw (2001-2015, Web of Science™).
NA=no analizado

Zona bajo estudio	Especie	Concentración (ng/g)					Ref
		4-tOP	4-n-OP	4-n-NP	NP	BPA	
Mar Adriático (Italia)	Almeja. <i>Chamelea gallina</i> Linnaeus, 1758	2,7-2,8	NA	NA	243-265	NA	(1)
	Mejillón. <i>Mytilus galloprovincialis</i> Lamarck, 1819	4,4-4,9	NA	NA	254-265	NA	
Lagos de Alemania	Mejillón. <i>Mytilus edulis</i> Linnaeus, 1758						(2)
	Mejillón. <i>Dreissena polymorpha</i> Pallas, 1771	0,3-0,6	NA	NA	<2-15	NA	
	Mejillón. <i>Abramis brama</i> Linnaeus, 1758						
Costa de Taiwan	Ostra. <i>Crassostrea gigas</i> Thunberg, 1793	20-1460	NA	NA	130-5190	NA	(3)
Lagos Venecia (Italia)	Mejillón. <i>Mytilus galloprovincialis</i> Lamarck, 1819	NA	NA	NA	115-240	<MQL	(4)
Bahía Masan (Corea)	Mejillón	NA	NA	NA	50-290	NA	(5)
Sur de Asia	Mejillón. <i>Perna viridis</i> Linnaeus, 1758	1,8-26,8	NA	NA	18-643	1,1-13,7	(6)
Bahía Masan (Corea)	Mejillón	NA	NA	NA	51-290	NA	(7)
Cataluña (España)	Mejillón	6,9	NA	NA	16-58	NA	(8)
Costa de Galicia (España)	Mejillón. <i>Mytilus galloprovincialis</i> Lamarck, 1819	9-31	<1,7	<2,3	9-372	3,3-11	(9)
Bahía San Francisco (EEUU)	Mejillón	NA	NA	NA	<20-95	NA	(10)

(1) [Ferrara y cols., 2001]; (2) [Wenzel y cols., 2004]; (3) [Cheng y cols., 2005]; (4) [Pojana y cols., 2007]; (5) [Wang y cols., 2007]; (6) [Isobe y cols., 2007]; (7) [Li y cols., 2008]; (8) [Sánchez-Avila y cols., 2011]; (9) [Salgueiro-González y cols., 2012]; (10) [Klosterhaus y cols., 2013]

Este estudio se centra en el río Miño, situado en el noroeste de la Península Ibérica, que transcurre principalmente por Galicia con menos de un 5% de su área en el norte de Portugal. Es el río más importante de la Comunidad Autónoma gallega y el sexto más importante de España, en términos de longitud y caudal. La principal actividad del río Miño es la producción de electricidad, pero también se llevan a cabo actividades industriales, náuticas, pesqueras y agrícolas, especialmente en el tramo de cuenca estudiado, que pueden afectar a su calidad medioambiental.

Por este motivo, el evaluar la presencia de contaminantes en esta zona es el primer paso para encontrar una estrategia adecuada para un uso y una protección de las aguas eficientes, considerando tanto aspectos socioeconómicos como ambientales. Aunque existen estudios previos en la bibliografía basados en el análisis de metales en los sedimentos de este río [Mil-Homens *y cols.*, 2013], no se han encontrado publicaciones relacionadas con el análisis de alquiflenoles y bisfenol A en este ecosistema.

2. RECOGIDA Y ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

2.1. Zona de muestreo y toma de muestra

El río Miño, con una longitud de aproximadamente 300 km y una superficie de cuenca de 17.100 km², nace en Serra da Meira (Lugo, España) y alcanza el océano Atlántico cerca de Caminha (Portugal) y A Guarda (España). Este estudio se centra en los últimos 75 km del río Miño, tramo denominado Baixo Miño, en los que define la frontera entre España y Portugal. En esta zona se sitúan diferentes municipios como Caminha, Cerveira y Valença en Portugal y A Guarda, O Rosal, Tomiño y Tui en España, con una densidad de población media de 206 habitantes/km² [Vale *y cols.*, 2014]. El caudal del río Miño oscila entre 127 y 500 m³/s, con un valor medio de 300 m³/s [SNIRH, 2015]. En la Figura 53 se refleja la localización del río Miño y tres de sus principales afluentes: Louro, Coura y Tamuxe.

El estuario del río Miño abarca unos 40 km de longitud. Se considera un estuario parcialmente mezclado (30 km de agua superficial), en el que las mareas tienen una gran influencia, oscilando el volumen del estuario de acuerdo con la pleamar y la bajamar; sin embargo, en períodos lluviosos que dan lugar a la crecida del río se convierte en un estuario de cuña salina [Sousa *y cols.*, 2008a]. Las distintas características morfológicas y salinas a lo largo del cauce del río han ocasionado que España y Portugal identifiquen, en el marco de la WFD, cuatro tipos de cuerpos de agua (WB1, WB2, WB3 y WB4) mostrados en la Figura 53. La distancia de cada tramo en el eje longitudinal es la siguiente: 2,6 Km el WB1; 5,7 Km el WB2; 13,5 Km el WB3 y 15,6 Km el WB4 [Vale *y cols.*, 2014].

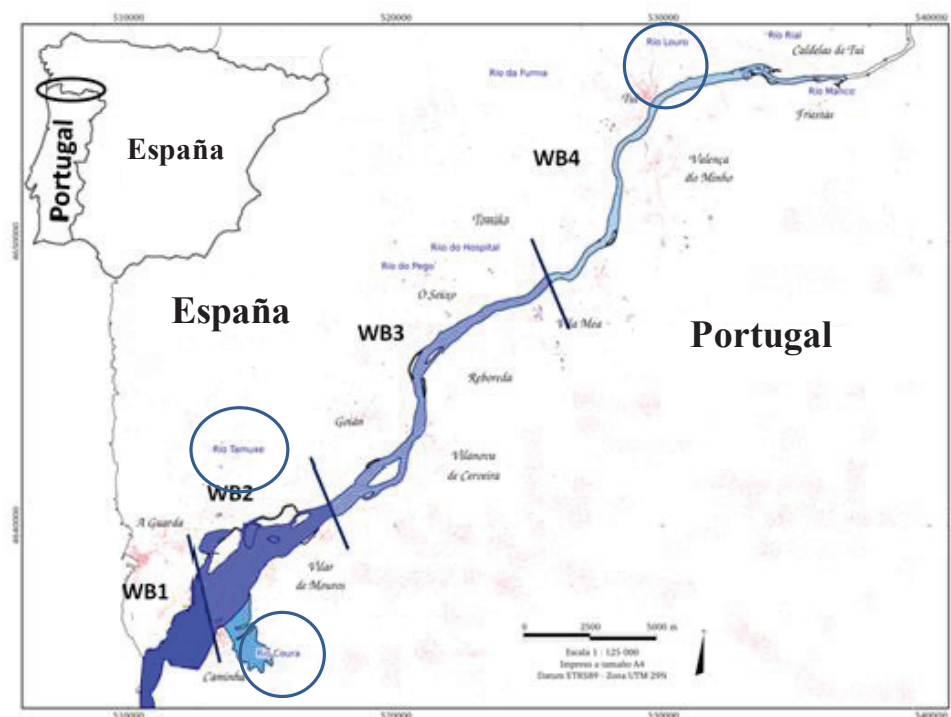


Figura 53. Localización del río Miño y sus tres afluentes (Louro, Coura y Tamuxe). Límites de los distintos cuerpos de agua (WB) [Vale y cols., 2014]

Se realizan dos campañas de muestreo en el río Miño durante 2012: una del 21-25 de Mayo y otra del 26-30 de Noviembre, en colaboración con el Instituto Español de Oceanografía de Vigo (IEO-Vigo) y otros socios del proyecto “Team-Miño”. Las muestras se recogen a pie y con ayuda de pequeñas embarcaciones. El caudal medio del río en ambos muestreos es de 200 m³/s en Mayo y 365 m³/s en Noviembre, de acuerdo con los datos recogidos en la estación de muestreo 015 de la Confederación Hidrográfica Miño-Sil, situada en Salvaterra do Miño [CHMinoSil, 2015]. Este incremento del caudal medio puede explicarse con la pluviometría registrada en estas fechas, que aumenta de 4 mm en Mayo a 17 mm en Noviembre. Las muestras de agua, sedimento y *Corbícula fluminea* se recogen en diferentes estaciones de muestreo (Figura 54), seleccionadas de acuerdo a estudios previos y a la proximidad de las posibles fuentes de contaminación de los compuestos considerados en el proyecto de investigación “Team-Miño”.

Un total de trece muestras de agua se recogen en ocho estaciones de muestreo situadas a lo largo del cauce del río durante las dos campañas (Mayo y Noviembre de 2012) a distintas profundidades. En cinco de estas estaciones, localizadas en zona de transición, se recogen dos muestras de agua por estación, correspondientes a marea alta (ht) y marea baja (lt), lo que permite estudiar la influencia de los cambios de marea en la distribución de los compuestos. Los tres puntos restantes se sitúan en los afluentes Louro, Coura y Tamuxe. La recogida de las muestras se lleva a cabo utilizando botellas de vidrio de 2 L previamente lavadas y, a su llegada al laboratorio, éstas se almacenan un máximo de cinco días a 4°C hasta su análisis.

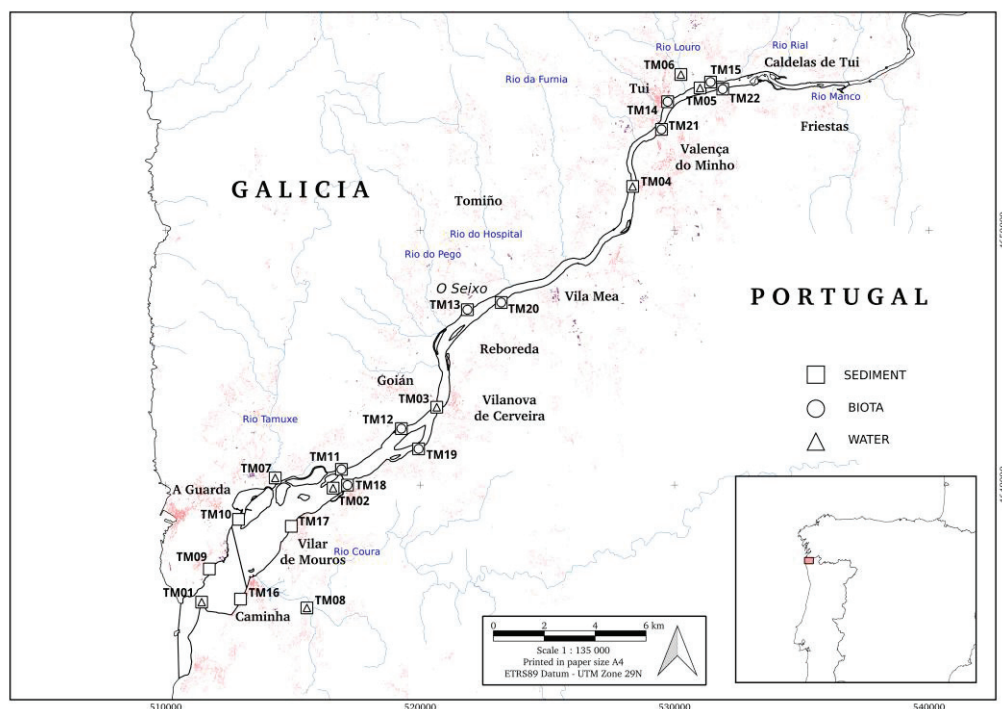


Figura 54. Mapa de la zona bajo estudio. Localización de las estaciones de muestreo de agua, sedimento y *Corbicula fluminea* (Müller, 1774)

Las muestras de sedimento superficial (0-4 cm de profundidad) se recogen utilizando una draga Van-Veen en 22 estaciones de muestreo (una muestra por estación) en Mayo de 2012. Antes de su análisis, las muestras se congelan a -20°C , se liofilizan, se homogenizan y se tamizan a través de 2 mm en el laboratorio.

La especie invasora *Corbicula fluminea* se selecciona para este estudio debido a su elevada presencia en el río Miño [Ilarri y cols., 2014; Sousa y cols., 2008b]. Las muestras se toman en 11 estaciones de muestreo (una muestra por estación) durante las dos campañas (Mayo y Noviembre de 2012). Los análisis se hacen en *pools* de tejidos blandos en los que se incluyen más de 20 individuos, de manera que se consideren todos los tamaños presentes en las estaciones de muestreo. Tras separarlas de la concha, las almejas se congelan a -20°C , se liofilizan, se homogenizan y se almacenan hasta su análisis.

2.2. Análisis de las muestras

Las muestras de agua, sedimento y biota se analizan aplicando metodologías analíticas novedosas, sencillas, rápidas, sensibles, selectivas y que cumplen con los principios de la Química Analítica Verde, desarrolladas en el Capítulo III (págs. 111-117), Capítulo IV (págs. 132-138) y Capítulo V (págs. 152-158) respectivamente, y que se comentan brevemente en las siguientes líneas.

Un volumen de 30 mL de agua se extrae con 100 μL de 1-octanol agitando durante 5 min mediante microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME). Tras una centrifugación (de 3 min a 3500 rpm) la gota de 1-octanol se recoge y se lleva a 1

mL de metanol antes de la inyección cromatográfica. Para las muestras de sedimentos liofilizadas (0,5 g) se aplica una extracción con líquidos a presión selectiva (SPLE) utilizando metanol como disolvente de extracción bajo las siguientes condiciones: una temperatura de 150°C, presión de 1500 psi, C₁₈ como agente dispersante (0,5 g) y alúmina básica como adsorbente de purificación (2 g). Esta misma técnica se aplica para la extracción de las muestras de *Corbícula fluminea* (0,5 g) previamente liofilizadas, pero utilizando una temperatura de 40°C y alúmina neutra como adsorbente de purificación (3g). En ambos casos, los extractos de la SPLE se concentran y se redisuelven en 1 mL de metanol. En las muestras de agua el efecto matriz se corrige utilizando patrones internos subrogados añadidos a la muestra antes del análisis; en las matrices sólidas se realizan rectas de adiciones estándar, a fin de asegurar una cuantificación fiable de los compuestos.

Todos los extractos finales se inyectan en un cromatógrafo de líquidos acoplado a un espectrómetro de masas con analizador triple cuadrupolo, para su análisis por LC-MS/MS en las condiciones optimizadas en el Capítulo III (pág. 112), escogiendo como modo de adquisición el MRM debido a su alta sensibilidad y selectividad. Para la interpretación de los resultados se seleccionan cuatro puntos de identificación para cada compuesto (un ion precursor y dos iones producto) de acuerdo con la Decisión de la Comisión 2002/657/CE [Decisión-2002/657]. La transición de mayor intensidad se utiliza para la cuantificación de los compuestos, mientras que los tiempos de retención y el cociente entre ambas transiciones (MRM ratio) lo hacen para su identificación y confirmación.

Para asegurar la fiabilidad de los resultados (QA/QC), se llevan a cabo rectas de calibrado, blancos de procedimiento y muestras sobrecargadas (ensayos de recuperación) durante el análisis de las muestras. Además, se evita el uso de material de plástico durante todo el procedimiento experimental, así como de detergentes en la limpieza del material de vidrio.

3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1. Estudio de APs y BPA en las aguas del río Miño: variación estacional, distribución espacial y fuentes de contaminación

Las concentraciones de alquilfenoles y bisfenol A observadas en las aguas durante las campañas de Mayo y Noviembre de 2012 se exponen en la Tabla 36. En el primer muestreo (Mayo) se observa una clara diferencia entre las concentraciones de los isómeros lineales y las de los ramificados: mientras que los lineales (4-*n*-OP y 4-*n*-NP) sólo se determinan en una estación de muestreo (TM02 en WB2) a concentraciones menores a 0,012 µg/L, los ramificados se encuentran en todas ellas, a concentraciones que varían entre 0,018 y 0,088 µg/L y 0,033 y 1,03 µg/L para el 4-*t*OP y el NP, respectivamente. Estos niveles son inferiores a los EQS establecidos por la Directiva 2013/39/UE [Directiva-2013/39]. En el caso del BPA se obtienen únicamente tres muestras positivas (TM01 en WB1, TM02 y TM03 en WB2) a concentraciones superiores a 3,7 µg/L. Dado que este compuesto no está incluido en la lista de las 45 sustancias prioritarias, no existen valores límite (EQS) en aguas; sin embargo, si los niveles observados se comparan con los valores de PNEC establecidos para la especie más sensible en agua dulce (*Pimephales promelas* Rafinesque, 1820; PNEC=1,6 µg/L [European-Commission, 2002]), éstos son tres veces superiores, indicando que es necesario realizar nuevos muestreos en estas estaciones para controlar si la concentración de BPA se mantiene a lo largo del tiempo, con el fin de preservar la fauna acuática.

Los concentraciones observadas en el segundo muestreo (Noviembre) son inferiores a las del primero (Mayo). Los niveles de 4-*t*OP, 4-*n*-OP, 4-*n*-NP son inferiores al límite de cuantificación del método correspondiente; el NP se determina en cuatro muestras (TM02-ht y TM07 en WB2, TM04-ht y TM05-ht en WB4) a concentraciones entre 0,04 y 0,089 µg/L. Los altos valores de concentración registrados en la campaña de Mayo para el BPA no se mantienen en la campaña de Noviembre, en la que no se ha determinado ninguna muestra positiva para este compuesto. Este hecho indica una variación en las fuentes de contaminación o en la distribución del BPA en el medio acuático (adsorción a los sedimentos o por bioacumulación en los organismos).

Tabla 38. Niveles ambientales ($\mu\text{g/L}$) de alquilfenoles y bisfenol A en aguas del río Miño durante Mayo y Noviembre de 2012. Las muestras positivas se muestran en negro

Estación de muestreo	4-tOP		4-n-OP		4-n-NP		NP		BPA	
	Mayo	Nov	Mayo	Nov	Mayo	Nov	Mayo	Nov	Mayo	Nov
TM01-ht	0,041	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	0,088	<MQL	0,46	<MQL
TM01-lt	0,064	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	0,061	<MQL	<MQL	<MQL
TM02-ht	0,037	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	0,044	0,069	<MQL	<MQL
TM02-lt	0,077	<MQL	0,012	<MQL	0,006	<MQL	1,03	<MQL	4,8	<MQL
TM03-ht	0,071	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	0,078	<MQL	<MQL	<MQL
TM03-lt	0,036	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	0,065	<MQL	3,7	<MQL
TM04-ht	0,088	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	0,057	0,089	<MQL	<MQL
TM04-lt	0,036	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	0,055	<MQL	<MQL	<MQL
TM05-ht	0,065	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	0,056	0,040	<MQL	<MQL
TM05-lt	0,018	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	0,040	<MQL	<MQL	<MQL
TM06	0,068	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	0,077	<MQL	<MQL	<MQL
TM07	0,048	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	0,033	0,058	<MQL	<MQL
TM08	0,027	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	0,038	<MQL	<MQL	<MQL

ht=marea alta y lt=marea baja
MQL ($\mu\text{g/L}$) : 4-tOP (0,008); 4-n-OP (0,006); 4-n-NP (0,005); NP (0,03); BPA (0,02)

Los niveles observados en el río Miño son similares a los del río Duero (Portugal) [Rocha *y cols.*, 2012] o a los de 22 ríos estudiados en China [Wang *y cols.*, 2013]; sin embargo, se han presentado concentraciones más altas en otros ríos de la Península Ibérica próximos a zonas industriales, como el Ter [Céspedes *y cols.*, 2006] o el Ibaizabal [Iparraguirre *y cols.*, 2012], o cercanos a estaciones depuradoras de aguas residuales, como el río Mondego en Portugal [Rocha *y cols.*, 2014].

Con el fin de tener una visión global de los contaminantes bajo estudio se calcula la concentración total de EDCs (EDC_T) en cada estación de muestreo, como la suma de los niveles individuales de cada compuesto. En el caso de muestras en las que el resultado obtenido se encuentra por debajo del MQL, se utiliza la mitad del valor de dicho MQL para el cálculo, de acuerdo con la Directiva 2009/90/CE [Directiva-2009/90]. En Mayo, los valores de EDC_T varían entre 0,08 y 5,9 $\mu\text{g/L}$ (valor medio: 0,888 $\mu\text{g/L}$), siendo el BPA el compuesto que más contribuye con un 78%, aproximadamente; en Noviembre, los niveles de EDC_T oscilan entre 0,007 y 0,021 $\mu\text{g/L}$ (valor medio: 0,01 $\mu\text{g/L}$), suponiendo el NP el 60% del total. La diferencia en los perfiles de contaminación de las aguas entre muestreos puede explicarse teniendo en

cuenta factores hidrodinámicos, biodegradación por microorganismos o reacciones de fotólisis [Wang *y cols.*, 2013; Wright-Walters *y cols.*, 2011].

Este estudio demuestra una distribución espacial uniforme del 4-tOP y NP a lo largo del río Miño y sus principales afluentes. Los niveles de fondo observados ($\sim 0,05 \mu\text{g/L}$) pueden ser debidos a descargas municipales, pues no existe conexión entre la mayoría de las viviendas y las EDAR de los distintos municipios por lo que más del 90% de las aguas residuales municipales se descargan directamente al cauce del río [INSAAR, 2010]. Las actividades agrícolas pueden ser otra fuente de contaminación difusa, pues aproximadamente una cuarta parte de la zona bajo estudio (15-30%) son áreas de cultivo [Vale *y cols.*, 2014]. La mayor concentración de NP se observan en la muestra TM02-lt (WB2); en este punto se desarrollan actividades náuticas y pesqueras, pudiendo ser los detergentes y otros productos químicos utilizados en la limpieza de los barcos la principal fuente de este compuesto. La presencia de isómeros lineales (4-*n*-OP y 4-*n*-NP) en este mismo punto sugiere la presencia de una EDAR (Tomiño con 13.000 hab), donde estos contaminantes se forman por la degradación de sus equivalentes etoxilados. Por otra parte, las altas concentraciones de BPA medidas en los puntos TM02-lt (WB2) y TM03-lt (WB3) se asocian a descargas industriales, como pueden ser la fabricación de resinas epoxi o el envasado de conservas.

3.2. Niveles y distribución espacial de APs y BPA en sedimentos

Los niveles de alquilfenoles y bisfenol A obtenidos en el muestreo de sedimentos llevado a cabo en Mayo de 2012 siguen el mismo patrón que el mostrado en aguas. Los isómeros 4-*n*-OP y 4-*n*-NP se determinan únicamente en una muestra (TM02 en WB2) a concentraciones inferiores a $2,5 \text{ ng/g dw}$; por su parte, los isómeros ramificados se observan en más del 86% de las muestras analizadas, a concentraciones que varían de $9,3$ a $74,5 \text{ ng/g dw}$ y de 21 a 4460 ng/g dw para el 4-tOP y NP, respectivamente. El valor más alto obtenido se corresponde con la muestra TM02 (WB2) y puede ser debido a, como ya se ha mencionado, actividades agrícolas, náuticas y pesqueras llevadas a cabo en la zona. Por último, la presencia del BPA se confirma en el 23% de las muestras, y su concentración varía entre $4,3$ y 130 ng/g dw . Cabe destacar el hecho que el BPA no se ha detectado en los sedimentos correspondientes a los puntos de muestreo donde se han determinado valores elevados de este compuesto en aguas (TM02 en WB2 y TM03 en WB3); esto indica que se trata de una descarga puntual y reciente, pues no ha transcurrido tiempo suficiente para que tenga lugar la adsorción del BPA a los sedimentos.

Los valores obtenidos en este estudio son dos órdenes de magnitud mayores a los mostrados en el río Llobregat durante 2005 y 2006 [Brix *y cols.*, 2010]; sin embargo, son similares a los observados en ese mismo río durante una campaña de muestreo posterior (2010-2011). Son también del mismo orden a los determinados en otros ríos de la Península Ibérica como el Ebro, Guadalquivir y Júcar (2010-2011) [Gorga *y cols.*,

2015] y a los determinados en Italia [Pojana *y cols.*, 2007] y en Canadá [Mayer *y cols.*, 2007]. Por otra parte, se han registrado concentraciones más elevadas (diez veces mayores) en sedimentos de Anzali (Irán) [Mortazavi *y cols.*, 2012].

La concentración total de EDCs, como se observa en la Figura 55, varía entre 13 y 4536 ng/g dw (valor medio: 1040 ng/g dw), correspondiéndose el máximo valor a la estación TM02 (WB2). En este mismo cuerpo de agua se sitúan las estaciones TM08 (río Coura) y TM011 en las que se determinan concentraciones superiores a los 2500 ng/g dw. En la gran mayoría de las muestras el NP es el compuesto predominante (95% de la concentración total), lo que demuestra la alta acumulación de este compuesto en los sedimentos.

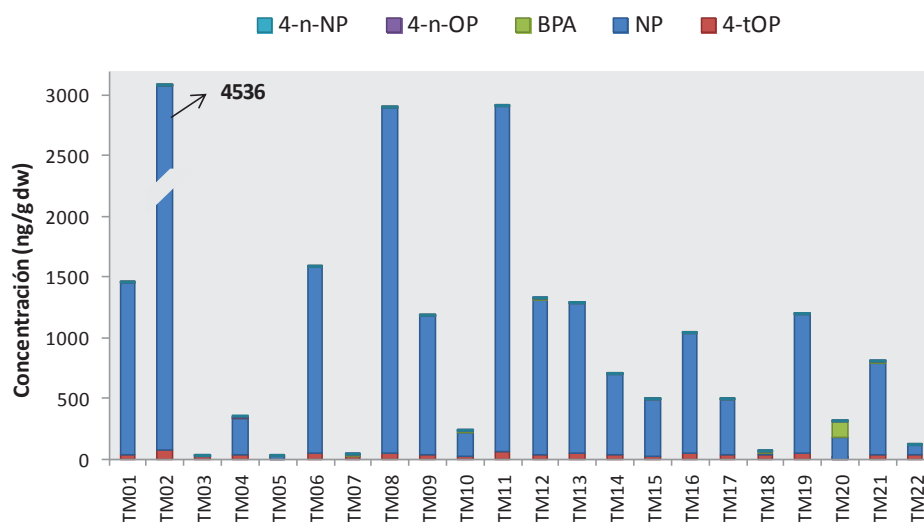


Figura 55. Concentración total de EDC (ng/g dw) encontrada en las muestras de sedimentos. Contribución de cada compuesto a la concentración total

3.3. Concentraciones de APs y BPA en biota: variación estacional y espacial

Las concentraciones observadas en las muestras de *Corbícula fluminea* recogidas en las campañas de Mayo y Noviembre de 2012 se representan en la Figura 56. En la primera campaña (Mayo) no se detecta la presencia de los isómeros lineales (4-*n*-OP y 4-*n*-NP), mientras que los ramificados se determinan en todas las muestras, a concentraciones entre 19,9 y 39,7 ng/g dw para el 4-*t*OP y entre 306 y 1756 ng/g dw para el NP. El hecho de que en el 80% de las muestras el NP supere los 1000 ng/g dw indica la alta bioacumulación del compuesto en esta especie. El BPA se ha encontrado en dos muestras (TM20 en WB3 y TM15 en WB4) a niveles de 31 y 412 ng/g dw, respectivamente.

En la segunda campaña (Noviembre) aumenta el número de muestras positivas con respecto a la primera. El 4-*n*-OP se observa en la muestra TM08 (río Coura) a un nivel de 15,2 ng/g dw y el 4-*n*-NP aparece en el 70% de las muestras, a concentraciones que varían entre 9 y 24,5 ng/g dw. A pesar de las bajas

concentraciones del 4-*n*-NP en las aguas, este compuesto está presente en un alto porcentaje de muestras de *Corbicula fluminea*, lo que demuestra su alta capacidad de bioacumulación y lo convierte en un candidato para las evaluaciones de riesgo ambiental. Por su parte, los isómeros ramificados se detectan en el 100% de las muestras, a niveles de 37,2 a 112 ng/g dw y de 368 a 2258 ng/g dw para el 4-tOP y el NP, respectivamente. El BPA se determina en el 63% de las muestras, a concentraciones comprendidas entre 3,7 y 28,6 ng/g dw.

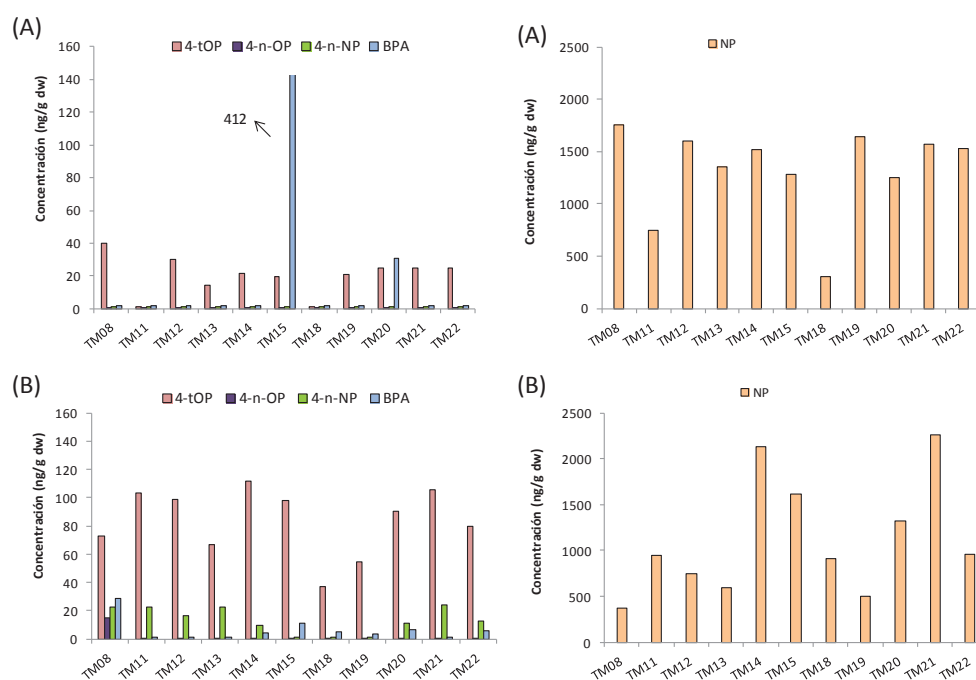


Figura 56. Niveles de alquilfenoles y bisfenol A (ng/g dw) en las muestras de *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) durante los muestreos de (A) Mayo y (B) Noviembre de 2012

En general, los valores recogidos en otros estudios para distintas especies [Ferrara *et al.*, 2001] son inferiores a los obtenidos en el río Miño; sin embargo, la comparación no es del todo precisa pues las características de las aguas y las especies son distintas según el estudio, afectando al resultado obtenido. De nuevo se demuestra la necesidad de continuar con el estudio de estos compuestos en esta zona.

La concentración total de EDCs (EDC_T) calculada para los dos muestreos variaba entre 310 y 1799 ng/g dw (valor medio de 1388 ng/g dw y mediana de 1560 ng/g dw) en Mayo y entre 507 y 2259 ng/g dw (valor medio de 1228 ng/g dw y mediana de 1057 ng/g dw) en Noviembre. En ambos casos el NP es el compuesto mayoritario, con más de un 95% del total.

3.4. Partición y bioacumulación de los EDCs bajo estudio en el medio acuático

El coeficiente de distribución (K_d) se utiliza frecuentemente para comprobar la capacidad que presenta un compuesto en fase líquida (agua) de adsorberse en una fase sólida (sedimento) [Zhou y cols., 2013]. En este estudio se ha evaluado la partición sedimento-agua de los alquilfenoles ramificados (4-tOP y NP), por ser los compuestos que más contribuyen a la concentración total de EDCs, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$K_d = (C_{\text{sed}}/C_{\text{agua}})$$

donde C_{sed} y C_{agua} son las concentraciones del compuesto en sedimento y agua, respectivamente. Los valores experimentales obtenidos, expresados como $\log K_d$, varían entre 2,1 y 3,3 para el 4-tOP (valor medio de 2,73) y entre 3,6 y 5,0 para el NP (valor medio de 4,3), lo que demuestra la gran afinidad de estos compuestos por los sedimentos. La diferencia de adsorción entre ambos compuestos puede ser explicada teniendo en cuenta su polaridad: los valores de K_d aumentan al disminuir la polaridad [Brix y cols., 2010]; además, el NP es una mezcla isomérica y cada isómero puede adaptarse a los diferentes sitios de adsorción presentes en el sedimento, favoreciendo la retención [Navarro-Ortega y cols., 2010]. Los valores de $\log K_d$ obtenidos en esta memoria son similares a los encontrados en otros estudios de la bibliografía [Brix y cols., 2010; Pojana y cols., 2007; Ying y cols., 2002].

Los factores de bioacumulación (BAF) y de acumulación biota-sedimento (BSAF) son utilizados habitualmente como medida en las evaluaciones de riesgo ambiental, ayudando a predecir la acumulación de un compuesto en la fauna acuática de una zona [USEPA-2000]. Se define BAF como el cociente (en L/Kg de tejido) entre la concentración de un contaminante en el tejido de un organismo acuático y su concentración en agua, en situación donde tanto el organismo como su alimento están expuestos a dicho contaminante. Por su parte, el BSAF es el cociente (en Kg de sedimento/Kg de tejido) entre la concentración de un compuesto en el tejido de un organismo acuático y su concentración en el sedimento superficial, en situaciones donde tanto el organismo como su alimento están expuestos al contaminante y el sedimento superficial es una media representativa del entorno del organismo.

En este estudio los parámetros se calculan para aquellos compuestos presentes en al menos tres puntos de muestreo de biota, agua y/o sedimento [Klosterhaus y cols., 2013] de acuerdo con las siguientes ecuaciones:

$$\text{BAF} = C_{C.\text{fluminea}}/C_{\text{agua}}$$

$$\text{BSAF} = C_{C.\text{fluminea}}/C_{\text{sed}}$$

donde $C_{C.\text{fluminea}}$ es la concentración de un compuesto en las muestras de *Corbicula fluminea*; C_{agua} es la concentración media de las aguas próximas al punto de muestreo

de biota y C_{sed} es la concentración de un sedimento superficial recogido en el punto de muestreo de biota correspondiente (Figura 46, pág. 203).

Los valores de BAF expresados en L/Kg son 439 ± 161 para el 4-tOP, $2788 \pm 83,8$ para NP en Mayo y $3649 \pm 131,5$ para NP en Noviembre. Los compuestos con valores de BAF superiores a 1000, 2000 y 5000 L/Kg se consideran bioacumulativos según la USEPA y la Agencia Medioambiental de Canadá [Arnot *y cols.*, 2006; Klosterhaus *y cols.*, 2013; USEPA-2000]; por tanto, mientras que el 4-tOP no es un compuesto bioacumulativo, el NP sí se considera bioacumulativo. Las diferencias obtenidas entre los BAF de ambas épocas del año para un mismo compuesto se pueden explicar en base a parámetros medioambientales (pH, temperatura, carbono orgánico total, etc.) y/o a características de los organismos (contenido lipídico, estado físico, sexo, etc.) que puede afectar al metabolismo de los compuestos [Arnot *y cols.*, 2006]. Las diferencias entre BAFs de distintos compuestos pueden estar relacionadas con el carácter hidrofóbico y el metabolismo. Dado que el 4-tOP y NP presentan propiedades similares, es posible que la diferente bioacumulación se rija por el metabolismo; sin embargo, no se ha encontrado bibliografía que permita afirmar este hecho.

Por otra parte, los BSAF obtenidos, y expresados como log BSAF, son de $1,56 \pm 0,43$ y $2,6 \pm 0,97$ para el 4-tOP y el NP, respectivamente. Estos valores son del mismo orden que los encontrados en la bibliografía para otras especies de almeja (*Ruditapes philippinarum* Adams and Reeve, 1850) y peces (*Sparus latus* Houlttuyn, 1782) [Zhang *y cols.*, 2011].

3.5. Impacto de APs y BPA en el medio ambiente y la salud humana

3.5.1. Evaluación del impacto ecológico: cocientes de peligrosidad (risk quotient)

La evaluación del impacto de los alquiflenoles y el bisfenol A en el medio acuático se lleva a cabo mediante el cálculo de cocientes de peligrosidad (RQ), definidos como el cociente entre la máxima concentración ambiental de un contaminante (MEC) y la concentración a la cual ese contaminante no produce efectos en una determinada especie (PNEC) [WorkingParty-EU-1994]. Tal y como se ha comentado en el Capítulo VI (págs. 178-179), cuando el valor de RQ está por debajo de 0,1 se considera que el riesgo ecológico es bajo; si está entre 0,1 y 1 moderado, y si es mayor que 1 el riesgo es alto [Blair *y cols.*, 2013].

En esta memoria se calculan dos cocientes de peligrosidad: el RQ_m , en el que se considera como MEC la media de las concentraciones observadas para cada compuesto y el RQ_{ex} (peor escenario de contaminación), en el que el valor de MEC es la máxima concentración detectada para cada EDC. Para el cálculo del valor medio de concentración se tienen en cuenta todas las muestras; en los casos en los que la concentración sea menor que el MQL, se considera la mitad de este límite, de acuerdo con la Directiva 2009/90/CE [Directiva-2009/90]. Como valores de PNEC se

seleccionan los publicados en diferentes documentos de la Unión Europea, en los cuales se considera la especie más sensible a cada contaminante en un ecosistema dado: 1,6 $\mu\text{g/L}$ para BPA (*Pimephales promelas Rafinesque, 1820*) [European-Commission, 2002]; 0,122 $\mu\text{g/L}$ para el 4-OP (*Oncorhynchus mykiss Walbaum, 1792*) [European-Commission, 2005a] y 0,33 $\mu\text{g/L}$ para 4-NP (*Scenedesmus subspicatus Chodat, 1926*) [European-Commission, 2005b].

Los cocientes de peligrosidad obtenidos se muestran en la Figura 49. Considerando las concentraciones medias (Figura 57A) se determina riesgo bajo o moderado ($RQ_m < 1$) para todos los compuestos a lo largo del río Miño y sus afluentes. Por el contrario, al considerar la máxima concentración detectada (Figura 57B), se observa alto riesgo ($RQ_{ex} > 1$) para el NP y el BPA. El alto valor de RQ_{ex} del NP es debido a su alta toxicidad mientras que el del BPA se relaciona con las altas concentraciones medidas en aguas de algunas estaciones de muestreo del río Miño. Es de destacar que son necesarios estudios más exhaustivos y prolongados en el tiempo sobre estos dos compuestos, con el fin de poder realizar una evaluación de riesgo más precisa y fiable.

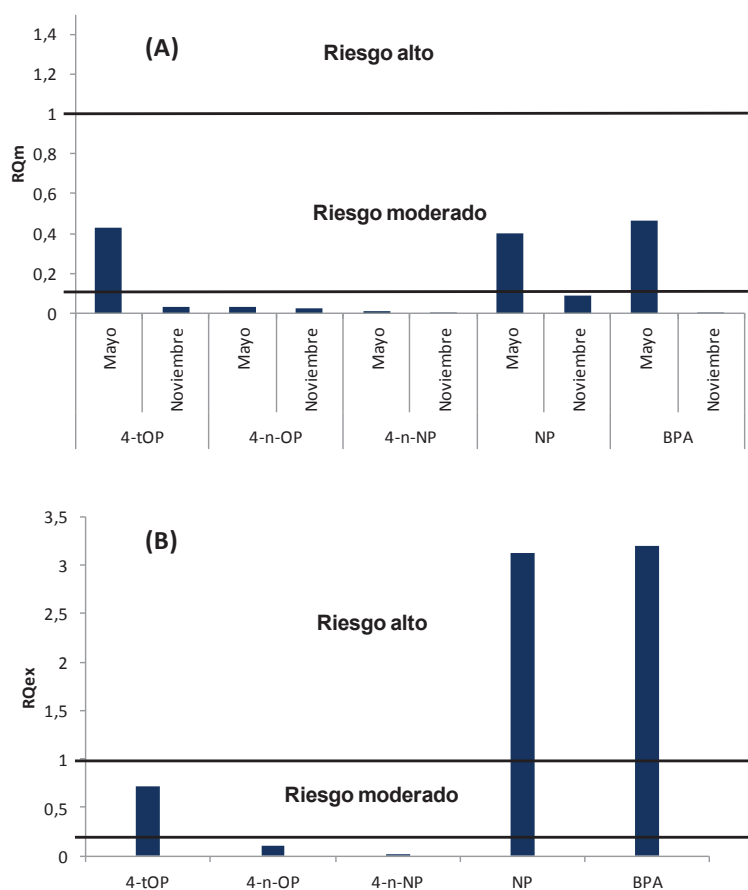


Figura 57. Cociente de peligrosidad del río Miño teniendo en cuenta: (A) la concentración media de cada compuesto (RQ_m) en cada muestreo y (B) el nivel de concentración máximo de cada EDC (RQ_{ex})

3.5.2. Evaluación del impacto en la salud humana asociado a la ingesta diaria de APS y BPA (daily intake estimations)

Para evaluar el impacto que la exposición a EDCs puede tener en la salud humana se pueden considerar diferentes parámetros, como el tipo y concentración de los compuestos, la duración, frecuencia y ruta de exposición o el metabolismo, entre otros [Plotan *y cols.*, 2014]. Si se tiene en cuenta que una persona no está expuesta a un único contaminante en su vida diaria, y que las mezclas de estos compuestos pueden tener efectos aditivos o provocar efectos negativos en el sistema celular de los seres vivos [Rudel *y cols.*, 2003], es necesario considerar los contaminantes en su conjunto a la hora de evaluar los posibles daños que pueden originar en la salud humana. Por ello, en esta memoria se estima, como una primera aproximación, el impacto que la ingesta de agua y almejas del río Miño supone para la salud de los habitantes de la zona, en términos de actividad estrogénica.

Como se ha indicado en el Capítulo VI (págs. 179-180), la actividad estrogénica se estima generalmente en términos de equivalentes de estradiol (EEQ), calculados de acuerdo con las siguientes ecuaciones:

$$EEQ_i = C_i \times EEF_i$$

$$EEQ_t = \sum EEQ_i$$

donde EEQ_i y EEQ_t son los equivalentes de estradiol de un compuesto i y del total de compuestos t , respectivamente; C_i es la concentración del compuesto i en el medio y EEF es el factor de equivalencia de estradiol. Por su parte, los EEF se definen como el cociente entre el valor de EC_{50} de un compuesto con respecto al valor de EC_{50} del 17-*beta*-estradiol (siendo EC_{50} la concentración a la cual se observan efectos en el 50% de la población). En este estudio se utilizan EEF encontrados en la bibliografía (Ver Tabla 32, pág. 180), determinados mediante ensayos *in vitro* de ER-CALUX y que varían entre 1,8E-007 (4-*n*-NP) y 6,0E-004 (BPA) [de Voogt *y cols.*, 2003; Zhang *y cols.*, 2011].

Los valores de EEQ_i y EEQ_t se calculan en las muestras de agua y *Corbícula fluminea* para las campañas de Mayo y Noviembre. Para las aguas, se obtiene un valor EEQ_t de 0,11 ng/L en el primer muestreo, cuatro órdenes de magnitud mayor que el determinado en el segundo (0,00009 ng/L). El NP es el compuesto que más contribuye a la actividad estrogénica de las aguas (hasta en un 70%), mientras que el 4-tOP y los isómeros lineales (4-*n*-OP y 4-*n*-NP) presentan una contribución mínima (<1%). En cuanto al BPA, es el segundo compuesto que más contribuye a la EEQ_t (~20%), a pesar de determinarse en sólo tres muestras. Considerando las muestras de *Corbícula fluminea* analizadas, la EEQ_t obtenida en Mayo (1,22 ng/L) es similar a la de Noviembre (1,01 ng/L); en ambos casos el compuesto predominante es el NP, con más de un 95% de la actividad estrogénica total.

Dado que la mayor actividad estrogénica de aguas y biota se observa en Mayo, esta campaña es la que se tiene en cuenta para estimar la exposición humana a estos EDCs, de manera que se considere el peor escenario de contaminación. Para

evaluar la ingesta de “agua contaminada” como vía de exposición se tienen en cuenta los valores de consumo diario de agua establecidos por la USEPA [EPA-1997], fijados en 0,18 L/d para niños y 1,4 L/d para adultos. Los niveles de exposición por ingesta de agua, en términos de EEQt, son de 0,019 ng/d y 0,15 ng/d para niños y adultos, respectivamente.

En el caso de ingesta de “organismos contaminados” con estos compuestos, se considera el consumo medio diario de moluscos en España, que es de 17,6 g/d para niños y 43,3 g/d para adultos, según la base de datos de la EFSA [EFSA, 2011]. Los niveles de exposición en este caso son de 4,28 y 10,50 ng/d para niños y adultos, respectivamente.

Finalmente, se suman los valores de exposición obtenidos en cada caso y se comparan con la ingesta diaria aceptable (ADI) del 17-*beta*-estradiol, fijada en 3,5 µg/d por la Organización para la Agricultura y la Alimentación (FAO). Los valores obtenidos son cuatro órdenes de magnitud menores que dicho valor, por lo que no se espera ningún efecto en la salud humana por ingesta de agua y/o almejas del río Miño. Sin embargo, es necesario realizar más estudios que confirmen los resultados obtenidos, así como otros estudios en los que se consideren otras rutas de exposición como la inhalación, la ingestión de otro tipo de alimentos o el contacto dérmico, a fin de obtener conclusiones firmes sobre este tema.

4. CONCLUSIONES

Se ha evaluado la presencia, distribución y bioacumulación de los alquilfenoles y el bisfenol A en aguas, sedimentos y almeja asiática (*Corbicula fluminea*, Müller, 1774) del río Miño. La presencia de estos EDCs en los tres compartimentos estudiados está asociada a descargas industriales, efluentes de estaciones depuradoras de aguas residuales y a actividades náuticas, pesqueras y agrícolas, consideradas como las principales fuentes de contaminación en la zona bajo estudio.

Se han determinado bajas concentraciones de los compuestos objeto de estudio (<0,1 µg/L) en las aguas analizadas, que no superan en ningún caso los valores de EQS establecidos en la Directiva 2013/39/UE, por lo que la zona estudiada presenta un “buen estado químico” con respecto a estos compuestos. Se observa una disminución de la concentración total de EDCs en aguas de Mayo (0,178 µg/L) a Noviembre (0,011 µg/L); sin embargo, los valores obtenidos en las muestras de *Corbicula fluminea* se mantienen (1338 y 1228 ng/g dw en Mayo y Noviembre, respectivamente). Los niveles de concentración total de EDC en sedimentos varían entre 13 y 4536 ng/g dw, con un valor medio de 1041 ng/g dw.

Los isómeros ramificados (4-tOP y NP) se han detectado en casi todas las muestras mientras que los lineales (4-*n*-OP y 4-*n*-NP) apenas han sido observados en este ecosistema. El 4-tOP se distribuye uniformemente en los tres compartimentos estudiados (agua, sedimento y biota); mientras que el NP, compuesto mayoritario,

tiende a asociarse a sedimentos y bioacumularse en biota. Por su parte, el BPA se encuentra a altas concentraciones en el agua en algunas estaciones de muestreo, mientras que su presencia en sedimento y biota es limitada; esto puede ser explicado teniendo en cuenta su polaridad media-alta y su elevada solubilidad en agua.

Se han estimado los factores de bioacumulación en la especie *Corbicula fluminea* y los de acumulación biota-sedimento para el 4-tOP y el NP, observándose una alta afinidad de ambos compuestos por los sedimentos, y una alta bioacumulación en organismos en el caso del NP. Se han calculado también los cocientes de peligrosidad, indicando riesgo bajo o moderado en el río Miño y sus afluentes (Louro, Coura y Tamuxe) debido a la presencia de APs y BPA. Finalmente, se ha evaluado el impacto de estos compuestos en la salud humana por ingesta de agua y almejas del río Miño y no se ha evidenciado riesgo alguno.

Cabe destacar que, aunque se trata de estudios preliminares cuyas conclusiones necesitan ser complementadas con investigaciones más exhaustivas, los resultados obtenidos demuestran el interés del análisis de estos compuestos en esta cuenca hidrográfica. La gran actividad agrícola y náutica de la zona, junto al hecho de que sólo un 10% de las descargas de las viviendas están conectadas a estaciones depuradoras de aguas residuales justifican la realización de nuevas investigaciones en el tramo final de la cuenca del río Miño.

Bibliografía

- Arnot, J.A., Gobas, F.A.P.C. *A review of bioconcentration factor (BCF) and bioaccumulation factor (BAF) assessments for organic chemicals in aquatic organisms*, Environ Rev (2006) 14, 257-297.
- Blair, B.D., Crago, J.P., Hedman, C.J., Klaper, R.D. *Pharmaceuticals and personal care products found in the Great Lakes above concentrations of environmental concern*, Chemosphere (2013) 93, 2116-2123.
- Brix, R., Postigo, C., Gonzalez, S., Villagrasa, M., Navarro, A., Kuster, M., de Alda, M.J.L., Barceló, D. *Analysis and occurrence of alkylphenolic compounds and estrogens in a European river basin and an evaluation of their importance as priority pollutants*, Anal Bioanal Chem (2010) 396, 1301-1309.
- Céspedes, R., Lacorte, S., Ginebreda, A., Barceló, D. *Chemical monitoring and occurrence of alkylphenols, alkylphenol ethoxylates, alcohol ethoxylates, phthalates and benzothiazoles in sewage treatment plants and receiving waters along the Ter River basin (Catalonia, N. E. Spain)*, Anal Bioanal Chem (2006) 385, 992-1000.
- Cheng, C.Y., Liu, L.L., Ding, W.H. *Determination of xenoestrogens alkylphenols in oyster and snail tissues by extractive steam distillation and gas chromatography-mass spectrometry*, J Chin Chem Soc (2005) 52, 1257-1262.
- Confederación Hidrográfica Miño Sil (2015). <http://www.chminosil.es/es/>
- de Voogt, P., van Hattum, B. *Critical factors in exposure modeling of endocrine active substances*, Pure Appl Chem (2003) 75, 1933-1948.

- Decisión de la Comisión 2002/657/CE, de 12 de agosto de 2002, por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados.
- Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 23 de octubre de 2000 por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas.
- Directiva 2009/90/CE de la Comisión del 31 de julio de 2009 por la que se establecen, de conformidad con la Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, las especificaciones técnicas del análisis químico y del seguimiento del estado de las aguas.
- Directiva 2013/39/UE del Parlamento Europeo y del Consejo de 12 de agosto de 2013 por la que se modifican las Directivas 2000/60/CE y 2008/105/CE en cuanto a las sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas.
- European Food Safety Authority (2011). *Comprehensive Food Consumption Database*
- EPA-1997, *Exposure Factors Handbook*, Environmental Protection Agency
- Common Implementation Strategy for the Water Framework Directive. Environmental Quality Standards, Substance Data sheet (25): octylphenol (para-tert-octylphenol), 2005.
- Common Implementation Strategy for the Water Framework Directive. Environmental Quality Standards (EQS). Substance Data sheet (24): Nonylphenols and 4-Nonylphenol, 2005.
- Updated European union risk assessment report 4,4'-Isopropylidenediphenol (bisphenolA). EUR 24588EN.
- Ferrara, F., Fabietti, F., Delise, M., Bocca, A.P., Funari, E. *Alkylphenolic compounds in edible molluscs of the Adriatic Sea (Italy)*, Environ Sci Technol (2001) 35, 3109-3112.
- Gorga, M., Insa, S., Petrovic, M., Barceló, D. *Occurrence and spatial distribution of EDCs and related compounds in waters and sediments of Iberian rivers*, Sci Total Environ (2015) 503, 69-86.
- Guruge, K., Horii, Y., Yamashita, N. *Profiles of nonylphenol isomers in surface waters from Sri Lanka*, Mar Pollut Bull (2011) 62, 870-873.
- Ilarri, M.I., Souza, A.T., Antunes, C., Guilhermino, L., Sousa, R. *Influence of the invasive Asian clam Corbicula fluminea (Bivalvia: Corbiculidae) on estuarine epibenthic assemblages*, Estuar Coast Shelf Sci (2014) 143, 12-19.
- Inventario Nacional de Sistemas de Abastecimiento de Água e de Águas Residuais (2010). <http://insaar.apambiente.pt>
- Iparraguirre, A., Navarro, P., Prieto, A., Rodil, R., Olivares, M., Fernandez, L.-A., Zuloaga, O. *Membrane-assisted solvent extraction coupled to large volume injection-gas chromatography-mass spectrometry for the determination of a variety of endocrine disrupting compounds in environmental water samples*, Anal Bioanal Chem (2012) 402, 2897-2907.
- Isobe, T., Takada, H., Kanai, M., Tsutsumi, S., Isobe, K.O., Boonyatumanond, R., Zakaria, M.P. *Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and phenolic endocrine disrupting chemicals in south and southeast Asian mussels*, Environ. Monit. Assess. (2007) 135, 423-440.
- Jonkers, N., Laane, R., de Graaf, C., de Voogt, P. *Fate modeling of nonylphenol ethoxylates and their metabolites in the Dutch Scheldt and Rhine estuaries: validation with new field data*, Estuar Coast Shelf Sci (2005) 62, 141-160.

- Klosterhaus, S.L., Grace, R., Hamilton, M.C., Yee, D. *Method validation and reconnaissance of pharmaceuticals, personal care products, and alkylphenols in surface waters, sediments, and mussels in an urban estuary*, *Environ Int* (2013) 54, 92-99.
- Koh, C.H., Khim, J.S., Villeneuve, D.L., Kannan, K., Giesy, J.P. *Characterization of trace organic contaminants in marine sediment from Yeongil Bay, Korea: 1. Instrumental analyses*, *Environ Pollut* (2006) 142, 39-47.
- Li, D., Dong, M., Shim, W.J., Yim, U.H., Hong, S.H., Kannan, N. *Distribution characteristics of nonylphenolic chemicals in Masan Bay environments, Korea*, *Chemosphere* (2008) 71, 1162-1172.
- Li, D.H., Oh, J.R., Park, J. *Direct extraction of alkylphenols, chlorophenols and bisphenol A from acid-digested sediment suspension for simultaneous gas chromatographic-mass spectrometric analysis*, *J Chromatogr A* (2003) 1012, 207-214.
- Li, J., Fu, J., Zhang, H., Li, Z., Ma, Y., Wu, M., Liu, X. *Spatial and seasonal variations of occurrences and concentrations of endocrine disrupting chemicals in unconfined and confined aquifers recharged by reclaimed water: A field study along the Chaobai River, Beijing*, *Sci Total Environ* (2013) 450, 162-168.
- Mayer, T., Bennie, D., Rosa, F., Rekas, G., Palabrica, V., Schachtschneider, J. *Occurrence of alkylphenolic substances in a Great Lakes coastal marsh, Cootes Paradise, ON, Canada*, *Environ Pollut* (2007) 147, 683-690.
- Mil-Homens, M., Costa, A.M., Fonseca, S., Trancoso, M.A., Lopes, C., Serrano, R., Sousa, R. *Characterization of Heavy-Metal Contamination in Surface Sediments of the Minho River Estuary by way of Factor Analysis*, *Arch Environ Contam Toxicol* (2013) 64, 617-631.
- Mortazavi, S., Bakhtiari, A.R., Sari, A.E., Bahramifar, N., Rahbarizade, F. *Phenolic endocrine disrupting chemicals (EDCs) in Anzali Wetland, Iran: Elevated concentrations of 4-nonylphenol, octylphenol and bisphenol A*, *Mar Pollut Bull* (2012) 64, 1067-1073.
- Navarro-Ortega, A., Tauler, R., Lacorte, S., Barceló, D. *Occurrence and transport of PAHs, pesticides and alkylphenols in sediment samples along the Ebro River Basin*, *J Hydrol* (2010) 383, 5.
- Petrovic, M., Fernandez-Alba, A.R., Borrell, F., Marce, R.M., Mazo, E.G., Barceló, D. *Occurrence and distribution of nonionic surfactants, their degradation products, and linear alkylbenzene sulfonates in coastal waters and sediments in Spain*, *Environ Toxicol Chem* (2002) 21, 37-46.
- Plotan, M., Elliott, C.T., Frizzell, C., Connolly, L. *Estrogenic endocrine disruptors present in sports supplements. A risk assessment for human health*, *Food Chem* (2014) 159, 157-165.
- Pojana, G., Gomiero, A., Jonkers, N., Marcomini, A. *Natural and synthetic endocrine disrupting compounds (EDCs) in water, sediment and biota of a coastal lagoon*, *Environ Int* (2007) 33, 929.
- Rice, C., Schmitz-Afonso, I., Loyo-Rosales, J., Link, E., Thoma, R., Fay, L., Altfater, D., Camp, M.J. *Alkylphenol and alkylphenol-ethoxylates in Carp, Water, and Sediment from the Cuyahoga River, Ohio*, *Environ Sci Technol* (2003) 37, 3747-3754.
- Rocha, M.J., Cruzeiro, C., Ferreira, C., Rocha, E. *Occurrence of endocrine disruptor compounds in the estuary of the Iberian Douro River and nearby Porto Coast (NW Portugal)*, *Toxicol Environ Chem* (2012) 94, 252-261.
- Rocha, M.J., Cruzeiro, C., Reis, M., Pardal, M.A., Rocha, E. *Spatial and seasonal distribution of 17 endocrine disruptor compounds in an urban estuary (Mondego River, Portugal): evaluation of the estrogenic load of the area*, *Environ. Monit. Assess.* (2014) 186, 3337-3350.

- Rudel, R.A., Camann, D.E., Spengler, J.D., Korn, L.R., Brody, J.G. *Phthalates, alkylphenols, pesticides, polybrominated diphenyl ethers, and other endocrine-disrupting compounds in indoor air and dust*, Environ Sci Technol (2003) 37, 4543-4553.
- Salgueiro-González, N., Turnes-Carou, I., Muniategui-Lorenzo, S., Lopez-Mahia, P., Prada-Rodríguez, D. *Fast and selective pressurized liquid extraction with simultaneous in cell clean up for the analysis of alkylphenols and bisphenol A in bivalve molluscs*, J Chromatogr A (2012) 1270, 80-87.
- Sánchez-Avila, J., Fernandez-Sanjuan, M., Vicente, J., Lacorte, S. *Development of a multi-residue method for the determination of organic micropollutants in water, sediment and mussels using gas chromatography-tandem mass spectrometry*, J Chromatogr A (2011) 1218, 6799.
- Schlenk, D., Sapozhnikova, Y., Irwin, M.A., Xie, L.T., Hwang, W., Reddy, S., Brownawell, B.J., Armstrong, J., Kelly, M., Montagne, D.E., Kolodziej, E.P., Sedlak, D., Snyder, S. *In vivo bioassay-guided fractionation of marine sediment extracts from the Southern California Bight, USA, for estrogenic activity*, Environ Toxicol Chem (2005) 24, 2820-2826.
- Sistema Nacional de Informação de Recursos Hídricos (2015). <http://snirh.apambiente.pt/>
- Sousa, R., Dias, S.C., Guilhermino, L., Antunes, C. *Minho River tidal freshwater wetlands: threats to faunal biodiversity*, Aquatic Biol (2008a) 3, 237-250.
- Sousa, R., Rufino, M., Gaspar, M., Antunes, C., Guilhermino, L. *Abiotic impacts on spatial and temporal distribution of Corbicula fluminea (Muller, 1774) in the River Minho Estuary, Portugal*, Aquat Conserv (2008b) 18, 98-110.
- Proyecto TEAM-Miño (2011-2013) (2011). www.team-minho.eu
- Methodology for Deriving Ambient Water Quality Criteria for the Protection of Human Health.
- Vale, C., Raimundo, J., Caetano, M. *Assessing pressures of anthropogenic activities and physico-chemical status according to the Water Framework Directive in the Minho River estuary*, TeamMinho Project. Entregable A2E1_ms_Pressures (2014) 15pp.
- Wang, B., Huang, B., Jin, W., Zhao, S.M., Li, F.R., Hu, P., Pan, X.J. *Occurrence, distribution, and sources of six phenolic endocrine disrupting chemicals in the 22 river estuaries around Dianchi Lake in China*, Environ. Sci. Pollut. Res. (2013) 20, 3185-3194.
- Wang, J., Dong, M., Shim, W.J., Kannan, N., Li, D. *Improved cleanup techniques for gas chromatographic-mass spectrometric determination of alkylphenols from biota extract*, J Chromatogr A (2007) 1171, 15-21.
- Wenzel, A., Bohmer, W., Muller, J., Rudel, H., Schroter-Kermani, C. *Retrospective monitoring of alkylphenols and alkylphenol monoethoxylates in aquatic biota from 1985 to 2001: Results from the German Environmental Specimen Bank*, Environ Sci Technol (2004) 38, 1654-1661.
- EU ad Hoc Working Party, III/5504/94. Draft 4. Assessment of potential risks to the environment posed by medicinal products for human use, excluding products containing live genetically modified organisms.
- Wright-Walters, M., Volz, C., Talbott, E., Davis, D. *An updated weight of evidence approach to the aquatic hazard assessment of Bisphenol A and the derivation a new predicted no effect concentration (Pnec) using a non-parametric methodology*, Sci Total Environ (2011) 409, 676-685.
- Ying, G.G., Williams, B., Kookana, R. *Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates - a review*, Environ Int (2002) 28, 215-226.

- Zhang, X., Gao, Y., Li, Q., Li, G., Guo, Q., Yan, C. *Estrogenic Compounds and Estrogenicity in Surface Water, Sediments, and Organisms from Yundang Lagoon in Xiamen, China*, Arch Environ Contamin Toxicol (2011) 61, 93.
- Zhang, Z., Ren, N., Kannan, K., Nan, J., Liu, L., Ma, W., Qi, H., Li, Y. *Occurrence of Endocrine-Disrupting Phenols and Estrogens in Water and Sediment of the Songhua River, Northeastern China*, Arch Environ Contam Toxicol (2014) 66, 361-369.
- Zhou, Z., Liang, Y., Shi, Y., Xu, L., Cai, Y. *Occurrence and Transport of Perfluoroalkyl Acids (PFAAs), Including Short-Chain PFAAs in Tangxun Lake, China*, Environ Sci Technol (2013) 47, 9249-9257.

Sección IV

Estancias de investigación

Resumen: En la sección IV Estancias de Investigación se recoge el trabajo llevado a cabo en dos estancias predoctorales de ámbito nacional e internacional. En ellas se ha complementado el tema central de esta Tesis Doctoral, pero también se ha abierto una nueva línea de investigación que se podrá seguir desarrollando en un futuro.

La primera estancia ha sido realizada en Barcelona en el Departamento de Química Ambiental del Instituto de Diagnóstico Ambiental y Estudios del Agua del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IDAEA-CSIC) bajo la dirección de la Dra. María José López de Alda de septiembre a diciembre de 2011. Se desarrolló un método multirresiduo para el análisis de EDCs en particulado atmosférico, compuestos hasta el momento poco estudiados en este compartimento ambiental. Además de la puesta a punto de un método y su posterior validación, se demostró la presencia de estos contaminantes asociados al particulado atmosférico y se evaluó la inhalación como vía de exposición humana.

La segunda ha sido desarrollada en Porto (Portugal) en el Instituto da Água da Região do Norte (IAREN) bajo la dirección de la Dra. María Fátima Alpendurada durante los meses de Abril a Julio de 2015. En ella se desarrollaron dos métodos de análisis de diferentes familias de pesticidas, algunos de ellos considerados disruptores endocrinos, en muestras de sedimento y algas. Tras la optimización y validación de las metodologías se analizaron muestras procedentes del río Mondego (Portugal), lo que ha permitido conocer la presencia de estos contaminantes en distintas matrices de la zona bajo estudio.

Summary: National and international PhD short stays are summarized in Research Stays section. These investigations contribute to the main objectives of this Doctoral Thesis and start a new research topic to consider in the future.

The first one took place in Barcelona (Spain), in the Environmental Chemistry Department of the Institute of Environmental Assessment and Water Research of the Spanish Council for Scientific Research (IDAEA-CSIC) under the supervision of Dra. María José López de Alda from September to December, 2011. A multi-residue analytical method for the determination of EDCs in airborne particles, compounds scarcely studied in this environmental compartment, was developed and validated. Furthermore, the presence of these pollutants in airborne particle was demonstrated and the possible human health impact was evaluated.

The second stay occurred in Porto (Portugal) in the Water Institute Northern Region (IAREN) directed by Dra. María Fátima Alpendurada (April-July, 2015) in where analytical methods for polar pesticides determination in sediment and alga samples were developed. Analytical methodologies were validated and applied to samples from Mondego River (Portugal) to know their presence and distribution of the selected pesticides in different matrices from the studied area.

CAPÍTULO VIII. Análisis de disruptores endocrinos en particulado atmosférico



- *Desarrollo y validación de un método de análisis de 13 EDCs en particulado atmosférico mediante PLE-LC-MS/MS*
- *Aditivos de plásticos como el NP, el DEP, el DBP y el DEHP determinados en todas las muestras analizadas*
- *Niveles de EDCs observados no suponen riesgo para la salud humana por inhalación*

Publicaciones científicas

“Determination of estrogenic endocrine disrupting compounds in airborne particles by pressurized liquid extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry”.

N.Salgueiro-González, María J.López de Alda, S. Muniategui-Lorenzo, D. Prada-Rodríguez, Damià Barceló. *Anal Bioanal Chem* (2013) 405, 8913-8923. Anexo IX (págs. 387 - 400)

“Analysis and occurrence of endocrine disrupting compounds in airborne particles”.

N.Salgueiro-González, María J.López de Alda, S. Muniategui-Lorenzo, D. Prada-Rodríguez, Damià Barceló. *TrAC Trends Anal Chem* (2015) 66, 45-52. Anexo X (págs. 401 - 410)

La Directiva 2004/107/CE [Directiva-2004/107] establece los principios básicos para definir y asegurar la calidad del aire ambiente. En ella se recogen los niveles límite de concentración de PAHs y metales en particulado atmosférico (PM₁₀) con el fin de evitar los posibles daños que estos compuestos pueden causar en la salud humana. Sin embargo, existen otros contaminantes que pueden estar presentes en el aire y, por tanto, deben ser considerados. Un claro ejemplo es el caso de los EDCs, que pueden aparecer asociados al particulado atmosférico debido a sus propiedades físico-químicas, como su baja presión de vapor, su polaridad media o su bajo peso molecular (<300 u.m.a.). Por el momento son pocos los estudios dirigidos a evaluar la presencia y distribución de los EDCs en el aire ambiente y la amplia mayoría se basa en la aplicación de métodos analíticos clásicos, por lo que requieren un amplio consumo de disolventes tóxicos y un gran tiempo de análisis. Por ello, es necesario desarrollar nuevas metodologías sencillas y sostenibles que permitan conocer el comportamiento de EDCs en el particulado atmosférico, así como el riesgo que estos compuestos suponen para la salud humana.

En este Capítulo se optimiza y valida un método analítico novedoso, rápido, sensible, selectivo y sostenible para la determinación simultánea de 13 EDCs (alquilfenoles, bisfenol A, ftalatos y hormonas sexuales) en la fracción inhalable del particulado atmosférico (PM_{2,5}), basado en una extracción con líquidos a presión seguida de la determinación por cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem (PLE-LC-MS/MS). La metodología se aplica al análisis de muestras de particulado atmosférico recogidas en zonas rurales, urbanas e industriales del área metropolitana de A Coruña, con el fin de obtener una primera visión de la distribución de los compuestos bajo estudio en esta zona. Finalmente, y como una aproximación inicial, se evalúa el riesgo que estos disruptores endocrinos suponen para la salud humana por inhalación. Tras detallar los aspectos clave de la optimización, del estudio de validación y de la aplicación a muestras, se recoge una comparativa entre la metodología propuesta y otras publicadas previamente, resaltando sus ventajas y aportaciones al análisis de EDCs en particulado atmosférico.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Compuestos bajo estudio

Aunque por el momento son escasos los estudios enfocados hacia la determinación de EDCs en particulado atmosférico ya se ha evidenciado la presencia de algunos de estos compuestos en dicha matriz, como los seleccionados en esta memoria (APs y BPA) o como los ftalatos (PEs), utilizados también como aditivos de plásticos, entre otras aplicaciones. Otros EDCs como las hormonas sexuales no han sido considerados todavía como contaminantes en aire ambiente, por lo que su presencia/ausencia en el particulado atmosférico es todavía desconocida.

Los 13 EDCs estudiados en esta memoria se comentan brevemente en las siguientes líneas, haciendo referencia a sus aplicaciones industriales y domésticas, su distribución en el medio ambiente y su toxicidad.

1.1.1. Alquilfenoles y bisfenol A

En este apartado solamente se mencionan aquellos compuestos incluidos en este estudio: el 4-*tert*-octilfenol (4-tOP), el 4-*n*-nonilfenol (4-*n*-NP), nonilfenol (NP) y bisfenol A (BPA), dado que ya se ha hecho referencia a estos contaminantes en el Capítulo I (págs. 11-18).

1.1.2. Ftalatos (PE)

Los ésteres del ácido ftálico, comúnmente conocidos como ftalatos (PE), son los ésteres dialquílicos o arílicos del ácido benceno 1,2-dicarboxílico. Estos compuestos se utilizan como aditivos en la producción de materiales plásticos y como antioxidantes, por lo que están presentes en muchos envases de productos destinados al consumo humano como ropa, cosméticos, fármacos, juguetes infantiles, etc. [Heudorf *y cols.*, 2007]. Debido a sus propiedades físico-químicas, aumentan la flexibilidad y transparencia del plástico, especialmente en aquellos polímeros de gran peso molecular como el cloruro de polivinilo (PVC) [Bergh *y cols.*, 2010].

Los ftalatos se descargan al medio ambiente directamente en los procesos de producción del plástico o indirectamente por evaporación. Dado que no existe unión química entre estos compuestos y el polímero, pueden filtrarse, migrar o evaporarse con facilidad al aire ambiente, alimentos, etc. [Heudorf *y cols.*, 2007]. La toxicidad aguda y crónica de estos compuestos es baja debido a que la bioacumulación a lo largo de la cadena trófica es limitada [Petrovic *y cols.*, 2002]; sin embargo, estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que algunos PE se comportan como disruptores endocrinos, compitiendo con las hormonas de 17-*beta*-estradiol en la unión con el receptor y afectando al sistema reproductor [Heudorf *y cols.*, 2007].

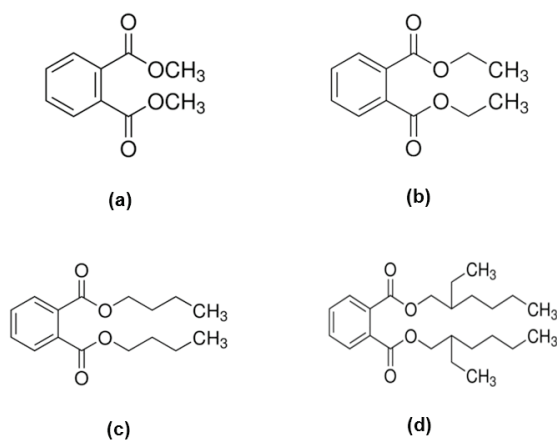


Figura 58. Estructuras químicas de los ftalatos bajo estudio: (a) dimetilftalato, (b) dietilftalato, (c) dibutilftalato y (d) dietilhexilftalato

En este Capítulo se incluyen cuatro diésteres de ftalato (Figura 58), los cuales presentan cadenas ramificadas iguales en los dos grupos funcionales. El dimetilftalato (DMP) y el dietilftalato (DEP), que presentan dos grupos metilo y etilo respectivamente, se utilizan en la fabricación de productos cosméticos y de higiene personal (perfumes, esmalte de uñas, laca, etc.) debido a su volatilidad [Rudel *y cols.*, 2010]. El dibutilftalato (DBP) está formado por dos grupos butilo y se utilizan como aditivo de polímeros. El dietilhexilftalato (DEHP) está formado por dos grupos hexilo, que presentan un grupo etilo en la posición C2. Es el ftalato más utilizado y a la vez más tóxico para el medio ambiente y la salud humana. Se utiliza también en la fabricación de plásticos, lo que justifica su ubiquidad en el medio y su consideración en diferentes normativas.

1.1.3. Hormonas sexuales naturales y sintéticas: estrógenos

Los estrógenos (Es) son hormonas sexuales esteroideas que se producen principalmente en los ovarios y que se encargan del desarrollo del sistema reproductor femenino. En función de su origen se distinguen dos grandes grupos: naturales, aquellas que se originan en el propio organismo, y sintéticas, aquellas que se comercializan para suplir o complementar a los naturales. Estas últimas se utilizan como anticonceptivos, en tratamientos del síndrome menopáusico, desórdenes menstruales y tratamientos de próstata y cáncer de mama [Kuster *y cols.*, 2004].

Las principales vías de entrada de las hormonas sexuales en el medio ambiente son a través de los efluentes de las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR), donde el procedimiento de eliminación no es completo, o a través de descargas directas, como las excreciones de humanos y animales. Estos compuestos son los disruptores endocrinos que presentan mayor potencia estrogénica, produciendo efectos negativos a concentraciones de ng/L [LaFleur *y cols.*, 2011; Zhang *y cols.*, 2014]. En el cuerpo humano los estrógenos se metabolizan en sus derivados glucurónidos y/o sulfatos. Los glucurónidos se eliminan con facilidad durante la excreción; sin embargo, los sulfatos son más persistentes y se mantienen hasta su llegada a las EDAR [LaFleur *y cols.*, 2011].

En este Capítulo se consideran cinco hormonas sexuales cuya estructura química se muestra en la Figura 59. Tres de ellas son estrógenos naturales: el 17-*beta*-estradiol (E2) y dos de sus metabolitos, la estrona (E1) y el estriol (E3). Las otras dos son sintéticas: el 17-*alfa*-etinilestradiol (EE2), usado ampliamente como anticonceptivo, y el dietilestilbestrol (DES), utilizado en la década de los cincuenta para prevenir abortos espontáneos y solucionar complicaciones en los embarazos. Años después se demostró que la exposición de mujeres embarazadas a DES ha supuesto problemas en el sistema reproductor de la descendencia [Olea Serrano *y cols.*, 2001], por lo que ha dejado de utilizarse para este fin, si bien no existe legislación que lo prohíba.

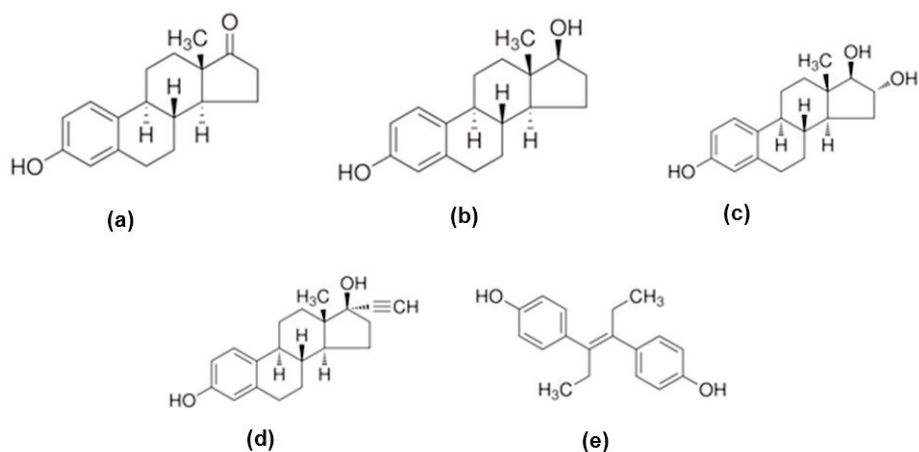


Figura 59. Estructura química de los estrógenos bajo estudio: (a) estrona, (b) 17-*beta*-estradiol, (c) estriol, (d) 17-*alfa*-etinilestradiol y (e) dietilestilbestrol

1.2. Metodologías analíticas utilizadas

La metodología analítica desarrollada para la determinación de estos compuestos en particulado atmosférico es escasa en comparación con la encontrada para el análisis de otras matrices ambientales [Salgueiro-González *y cols.*, 2015]; sin embargo, y teniendo en cuenta que estos EDCs pueden causar daño en la salud humana, su análisis es interesante. Aunque no existen valores límite establecidos en la legislación para la monitorización de estos compuestos en aire, se necesitan métodos de análisis sensibles y selectivos, de manera que se alcancen los bajos niveles ambientales a los que se presentan estos contaminantes (orden de ng/m^3).

Otro punto importante a tener en cuenta es la fracción de particulado atmosférico considerado en el análisis, aunque en la mayoría de los trabajos no se menciona esta información. Existen estudios centrados en la fracción de partículas de tamaño inferior a $10\ \mu\text{m}$ (PM_{10}) [Salapasidou *y cols.*, 2011], si bien cada vez más se estudian fracciones de menor tamaño como $\text{PM}_{2.5}$ o PM_1 [Fu *y cols.*, 2010].

La técnica instrumental más utilizada es la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (GC-MS), utilizando BSTFA como agente derivatizante [Berkner *y cols.*, 2004; Dachs *y cols.*, 1999; Matsumoto *y cols.*, 2005; Saito *y cols.*, 2004]. La etapa de derivatización alarga el procedimiento experimental y puede producir pérdidas de analito, por lo que algunos autores recurren a la cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas [Becouze *y cols.*, 2011; Sabatini *y cols.*, 2005]; además, la LC-MS permite mejores resultados en el caso de la mezcla técnica del NP, pues permite su elución en un único pico, facilitando su cuantificación.

En cuanto a la técnica de extracción, destacan las técnicas clásicas como la extracción Soxhlet [Dachs *y cols.*, 1999; Xie *y cols.*, 2006] o la extracción asistida por energía de ultrasonidos (US) [Berkner *y cols.*, 2004; Matsumoto *y cols.*, 2005; Sabatini *y cols.*, 2005; Saito *y cols.*, 2004], y otras más rápidas y sostenibles, como la PLE [Becouze *y cols.*, 2011]. En general, los disolventes de extracción más utilizados son hexano y

diclorometano, por lo que se requieren nuevos métodos que utilicen disolventes menos tóxicos, de acuerdo con la Química Analítica Verde.

Para aislar el compuesto de interés de otros interferentes presentes en la matriz, y alcanzar bajos límites de cuantificación, suele ser necesario realizar una etapa de purificación posterior. Se suele llevar a cabo una extracción en fase sólida (SPE) utilizando alúmina [Dachs *y cols.*, 1999] o gel de sílice [Berkner *y cols.*, 2004; Salapasidou *y cols.*, 2011; Xie *y cols.*, 2006] como adsorbentes.

2. DESARROLLO DE UN METODO DE EXTRACCIÓN CON LÍQUIDOS A PRESIÓN Y DETERMINACIÓN POR LC-MS/MS PARA EL ANALISIS DE 13 EDCs EN PARTICULADO ATMOSFÉRICO

El método de análisis seleccionado en este estudio (PLE-LC-MS/MS) consta de las siguientes etapas: extracción con líquidos a presión (PLE), evaporación del extracto obtenido y determinación mediante LC-MS/MS. El desarrollo de cada etapa del procedimiento experimental, el estudio de validación de la metodología y su aplicación a muestras se detalla a continuación.

2.1. Reactivos, material e instrumentación

Los patrones individuales de los 13 EDCs bajo estudio de elevada pureza (>97%) son de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania): 17-*beta*-estradiol (E2) y sus metabolitos estrona (E1) y estriol (E3), 17-*alfa*-etinilestradiol (EE2) y dietilestilbestrol (DES); tres alquilfenoles, 4-*tert*-octilfenol (tOP), 4-*n*-nonilfenol (4-*n*-NP) y nonilfenol mezcla técnica (NP); bisfenol A (BPA); y cuatro ésteres de ftalato, dimetilftalato (DMP), dietilftalato (DEP), dibutilftalato (DBP) y dietilhexilftalato (DEHP). Los patrones marcados isotópicamente empleados en la cuantificación de los compuestos son: estrona-2,4,16,16- d_4 (E1- d_4), 17-*beta*-estradiol 2,4,16,16,17- d_5 (E2- d_5), estriol-2,3,4- d_3 (E3- d_3), bisfenol A- d_{16} (BPA- d_{16}), dimetilftalato-3,4,5,6- d_4 (DMP- d_4), dietilftalato-3,4,5,6- d_4 (DEP- d_4), dibutilftalato-3,4,5,6- d_4 (DBP- d_4), bis(2-etilhexil)ftalato-3,4,5,6- d_4 (DEHP- d_4) y una solución de 4-*tert*-octilfenol-3,5- d_2 (tOP- d_2) en acetona (1 mg/L) de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania); 17-*alfa*-etinilestradiol-2,4,16,16- d_4 (EE2- d_4) y una solución de 4-*n*-nonilfenol- d_8 (4-*n*-NP- d_8) en acetona (100 mg/L) de Dr. Ehrenstofer GmbH (Augsburg, Alemania).

La determinación se lleva a cabo utilizando un cromatógrafo de líquidos 2690 serie Alliance de Waters (Milford, MA) con una bomba cuaternaria y automuestreador con capacidad para 120 viales acoplado a un espectrómetro de masas LC Quattro de Micromass (Manchester, Reino Unido) equipado con un sonda de electrospray asistida neumáticamente y una interfaz Z-spray. El Software utilizado es MassLynx 4.0 de Waters (Milford, MA). Para la separación cromatográfica se utiliza una columna Purospher STAR RP-18 125 x 2.0 mm; 5 μ m partícula, precedida por una precolumna del mismo material y dimensiones 4 x 4 mm, 5 μ m partícula, ambas de Merck

(Darmstadt, Alemania). Los disolventes de las fases móviles son metanol, acetonitrilo y agua calidad HPLC y el modificador empleado es ácido acético calidad analítica de Merck (Darmstadt, Alemania).

Para la extracción se utiliza un sistema de extracción acelerada ASE® 200 (Dionex, Sunnyvale, CA, U.S.A.) con celdas de extracción de acero inoxidable de 11 mL y filtros de fibra de vidrio (Ø 19,8 mm) de Whatman (Kent, UK). Como disolvente de extracción se utiliza metanol grado HPLC de Merck (Darmstadt, Alemania) y para el relleno de las celdas Hydromatrix® de Varian (Palo Alto, CA). La concentración de los extractos bajo corriente de nitrógeno se realiza, en primer lugar, en un evaporador Turbo Vap LV de Zymark (Hopkinton, MA), seguido de un evaporador Pierce-Reactive Vap III de Rockford (IL, Estados Unidos). Para el estudio de la etapa de purificación mediante extracción en fase sólida se utiliza un sistema Baker LSE 12G de J.T. Baker (Deventer, Holanda) conectado a un sistema de vacío. Los cartuchos utilizados son LiChrolut C₁₈ (500 mg) de Merck (Darmstadt, Alemania).

2.2. Desarrollo del método instrumental LC-MS/MS

Los métodos instrumentales utilizados para la determinación de los compuestos bajo estudio se desarrollan partiendo de otros optimizados previamente en el Departamento de Química Ambiental del Instituto de Diagnóstico Ambiental y Estudios del Agua del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IDAEA-CSIC).

Dado que los ftalatos se determinan en modo de ionización positivo (PI) y el resto de compuestos en modo negativo (NI), es necesario disponer de dos métodos de determinación LC-MS/MS. En el caso de los ftalatos se utiliza como fase móvil una mezcla de (A) agua con 0,1% de ácido acético como modificador y (B) metanol; para los APs, BPA y Es (determinación simultánea de 9 EDCs) se emplea una mezcla de (A) agua y (B) acetonitrilo. En la Tabla 39 se muestra el gradiente utilizado en cada método. Otros parámetros a tener en cuenta son la temperatura de la fuente y de la sonda. En el caso de modo PI las temperaturas son 350°C y 80°C respectivamente; para el modo NI, 450°C y 150°C. La descarga de corona es -3 kV en ambos casos.

Tabla 39. Gradiente de elución utilizado para la determinación de los disruptores endocrinos bajo estudio

Ftalatos						Estrógenos, APs y BPA					
t (min)	0	4	6	26	31	t (min)	0	8	20	30	35
A	60	10	0	0	60	A	70	15	0	0	70
B	40	90	100	100	40	B	30	85	100	100	30

Para la interpretación de los resultados, se consideran cuatro puntos de identificación (un ion precursor y dos iones producto) para la confirmación y cuantificación de los compuestos, de acuerdo con la Decisión de la Comisión 2002/657/CE [Decisión-2002/657]. Además del tiempo de retención de los compuestos, la relación de las dos transiciones MRM se utiliza como criterio de identificación, a fin de evitar falsos positivos y sobreestimaciones en los resultados. Estos parámetros se muestran en la Tabla 40.

Tabla 40. Tiempo de retención y parámetros MS/MS del método optimizado

EDC	ESI	t _R (min)	Precursor (m/z)	Iones producto (m/z)	Cono (V)	Energía de colisión (eV)	Relación MRM
<i>Compuestos analizados en modo negativo</i>							
E1	NI	9.65±0.02	269 (M-H)	145 , 143	50	40, 45	3,52±0,19
E1-d ₄	NI	9.62±0.02	273 (M-H)	147	50	40	-
E2	NI	8.93±0.02	271 (M-H)	145 , 183	50	45, 45	1,05±0,1
E2-d ₅	NI	8.87±0.01	276 (M-H)	147	50	45	-
E3	NI	4.32±0.03	287 (M-H)	145 , 171	50	40	1,07±0,03
E3-d ₃	NI	4.27±0.02	290 (M-H)	173	50	40	-
EE2	NI	9.35±0.02	295 (M-H)	145 , 159	50	40	2,12±0,2
DES	NI	9.82±0.03	267 (M-H)	222 , 237	30	35, 50	5,21±2,76
EE2-d ₄	NI	9.31±0.03	299 (M-H)	147	50	40	-
BPA	NI	8.69±0.02	227 (M-H)	212 , 133	35	15, 25	1,85±0,09
BPA-d ₁₆	NI	8.66±0.02	233 (M-H)	138 , 215	35	20, 25	-
tOP	NI	12.79±0.02	205 (M-H)	133 , 116	35	25	8,9±0,3
tOP-d ₂	NI	12.77±0.09	207 (M-H)	135	35	25	-
4nNP	NI	16.36±0.04	219 (M-H)	106 , 119	35	20	22,4±0,4
NP	NI	14.24±0.04	219 (M-H)	133 , 147	40	25	9,97±0,56
4nNP-d ₈	NI	16.21±0.07	227 (M-H)	112	35	15	-
<i>Compuestos analizados en modo positivo</i>							
DMP	PI	8.10±0.03	195 (M-H ⁺)	163 , 133	5	10, 25	3,75±0,14
DMP-d ₄	PI	8.13±0.007	198 (M-H ⁺)	167	10	15, 25	-
DEP	PI	9.56±0.02	223 (M-H ⁺)	149 , 177	5	20, 10	1,51±0,03
DEP-d ₄	PI	9.53±0.01	227 (M-H ⁺)	153	5	20, 10	-
DBP	PI	11.63±0.05	279 (M-H ⁺)	149 , 205	5	15, 5	3,11±0,39
DBP-d ₄	PI	11.64±0.01	283 (M-H ⁺)	153	10	15, 5	-
DEHP	PI	15.33±0.04	391 (M-H ⁺)	149 , 167	10	20, 15	8,44±0,70
DEHP-d ₄	PI	15.28±0.04	395 (M-H ⁺)	153	10	20, 15	-

2.3. Estudio parámetros PLE

Entre los parámetros que influyen en la extracción PLE destacan el disolvente de extracción o el número de ciclos. Estos y otros parámetros del procedimiento experimental se discuten a lo largo de este apartado, utilizando para los ensayos de optimización filtros de fibra de microcuarzo de 15 cm de diámetro Munkell (Bärenstein, Alemania), tanto sin muestrear como muestreados (PM_{2,5}). Antes de la toma de muestra, los filtros se acondicionan a 400°C en la mufla durante 12 horas y se dejan 48 horas en el desecador. Posteriormente, los filtros se pesan en condiciones constantes de temperatura (20 ± 1 °C) y humedad relativa ($50 \pm 5\%$) de acuerdo con la Norma Europea UNE-EN-12341 [UNE, 1999]. El particulado atmosférico se recoge con ayuda de muestreadores de alto volumen (Digitel y MCV) a un flujo de 30 m³/h durante 24 horas y, tras su llegada al laboratorio, los filtros muestreados se almacenan refrigerados (-18°C) hasta su análisis.

2.3.1. Preparación de la muestra y llenado de la celda de extracción

Las celdas de extracción se preparan de la siguiendo el esquema de llenado comentado en el Capítulo II (pág. 61). En la parte inferior de la celda se colocan la muestra de particulado atmosférico (porciones de filtro esféricas cortadas utilizando un sacabocados individual de ocho calibres) y, posteriormente, esta se rellena con el adsorbente inerte comercial Hydromatrix®, con el fin de evitar volúmenes muertos en la celda y asegurar la reproducibilidad de la extracción. Para los ensayos de optimización y validación del método las muestras se sobrecargan con una concentración conocida de compuestos y se dejan 24 horas a 4°C, para garantizar el contacto entre analito y matriz.

2.3.2. Problemas de contaminación de blancos

Para minimizar los problemas de blancos se evita el uso de detergentes y material de plástico durante todo el procedimiento experimental. El estudio inicial de blancos llevado a cabo revela la presencia del NP, DEP, DBP y DEHP a concentraciones inferiores a 1 ng/mL. Por ello, los blancos instrumentales y los de procedimiento se revisan frecuentemente y se mantienen bajo control. Además, en el caso de los blancos de procedimiento se realizan análisis por triplicado y la contribución de cada compuesto se resta a la señal obtenida en las muestras para evitar sobreestimaciones en los resultados.

2.3.3. Estudio del disolvente de extracción y el número de ciclos

Los primeros ensayos de optimización se llevan a cabo con ½ filtro sin muestrear (no contiene particulado atmosférico). En primer lugar se estudia el disolvente de extracción. Debido a la diferencia de polaridades que presentan los EDCs bajo estudio se lleva a cabo una extracción secuencial utilizando los siguientes

disolventes y mezclas: metanol, metanol: acetona (50:50), acetona, acetona: hexano (50:50), diclorometano y hexano. El resto de parámetros de la PLE son 50°C de temperatura [Petrovic *y cols.*, 2003], presión de 1500 psi y 1 ciclo de extracción de 3 min. Los extractos de PLE se evaporan y se reconstituyen en 1 mL de MeOH que contiene los correspondientes patrones deuterados. Los resultados obtenidos ($n=3$) muestran que todos los compuestos se extraen en las tres primeras extracciones (recuperación absoluta mayor del 60%), excepto el DEHP, que presenta una baja recuperación (inferior al 20%) debido a su baja polaridad ($\log K_{ow}=7,73$).

El siguiente paso es seleccionar el número de ciclos de extracción. Para ello se repite el ensayo anterior con los tres disolventes más polares (metanol, metanol: acetona (50:50) y acetona) y con una nueva mezcla, diclorometano: metanol (70:30 v/v), con la que se pretende mejorar la mala recuperación obtenida para el DEHP. Los filtros sin muestrear se extraen con tres ciclos de cada disolvente; los extractos de los dos primeros ciclos se recogen en un mismo vial, mientras que el tercero se recoge en un vial diferente. Además, se prueba con una extracción secuencial de un ciclo de metanol y otro de metanol:acetona (50:50) que se recoge en el mismo vial. En el caso de los APs y de algunos Es, los mejores resultados se obtienen con tres ciclos de metanol (recuperaciones absolutas superiores al 65%); sin embargo, el resto de los compuestos presentan mayores recuperaciones con tres ciclos de metanol: acetona (50:50).

A fin de tomar una decisión acertada sobre el disolvente de extracción y el número de ciclos, la metodología se aplica al análisis de filtros muestreados para comprobar si los resultados observados se mantienen a pesar de la posible influencia de la matriz. Los filtros se extraen con tres ciclos de metanol (100%) y de la mezcla metanol: acetona (50:50), observándose los resultados que se muestran en la Figura 60. Tanto las recuperaciones absolutas como las relativas son similares en la mayoría de los casos, independientemente del disolvente utilizado, excepto en el caso del DBP y el DEP para los que los mejores resultados se obtienen con metanol (el DBP no se recupera con la mezcla metanol: acetona (50:50) y para el DEP se obtienen recuperaciones superiores al 200%). Por otra parte, las DER% obtenidas con metanol son menores (inferiores al 25% en todos los casos). A la vista de estos resultados se selecciona el metanol como disolvente de extracción.

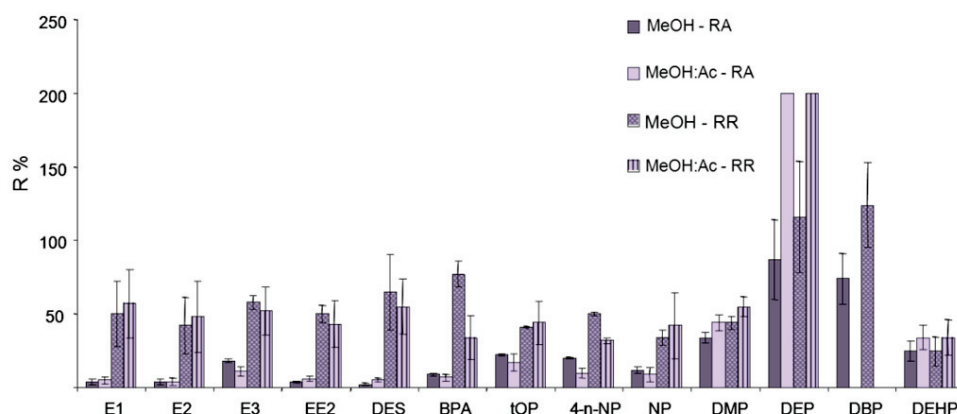


Figura 60. Recuperaciones absolutas (RA) y relativas (RR) obtenidas tras la extracción con tres ciclos de metanol (MeOH) y metanol: acetona (50:50) (MeOH:Ac)

2.3.4. Cantidad de muestra y etapa de purificación

Las recuperaciones absolutas obtenidas al analizar filtros muestreados con tres ciclos de metanol son inferiores al 20% para compuestos como los estrógenos o el BPA, mientras que al utilizar filtros no muestreados eran superiores al 65%. Esto indica una influencia clara de la matriz (particulado atmosférico); por ello, se plantea una nueva serie de ensayos, a fin de mejorar las recuperaciones observadas. Por una parte, se estudia la cantidad de muestra utilizada para el análisis y por otra se contempla la posibilidad de añadir una etapa de purificación en el proceso experimental, basada en una extracción en fase sólida (SPE).

Distintas porciones de filtro (1/2, 1/4 y 1/8 de filtro) se sobrecargan con los compuestos bajo estudio y sus análogos deuterados y se extraen de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente. Este ensayo se repite, pero añadiendo la etapa de purificación mediante SPE tras la extracción. En este caso, los extractos de PLE se evaporan bajo corriente de nitrógeno hasta aproximadamente 1 mL, se redisuelven en 100 mL de agua calidad HPLC y se pasan a través de los cartuchos de LiChrolut C₁₈ (500 mg) con ayuda de un sistema de vacío (-15 psi). Las muestras se cargan a un flujo de 5 mL/min y se eluyen con 2 x 4 mL de metanol. A fin de evitar la coelución de interferentes, los cartuchos se acondicionan previamente con 7 mL de metanol y 3 mL de agua grado HPLC a un flujo de 1 mL/min. Los eluatos obtenidos se evaporan a sequedad y se redisuelven en 1 mL de metanol.

En la Figura 61 se muestran las recuperaciones absolutas de los compuestos bajo estudio (A) y de sus análogos deuterados (B) obtenidos en estos ensayos. A medida que disminuye la cantidad de muestra, se produce una disminución del efecto matriz, y por lo tanto se produce un aumento significativo de señal, sobre todo en el caso de los estrógenos. Así, los mejores resultados (recuperaciones absolutas superiores al 40% en todos los casos) se obtienen utilizando 1/8 de filtro como cantidad de muestra. En cuanto a los resultados obtenidos con la SPE, no se muestran

mejoras significativas. Las recuperaciones obtenidas son menores en la mayoría de los casos, debido a una posible retención de los compuestos en los cartuchos. Además, se observan problemas de contaminación de blancos en el caso del DEP y del DBP (recuperaciones absolutas superiores al 300%), compuestos que probablemente están presentes en los cartuchos de plástico. Teniendo en cuenta estos resultados, y con el fin de disminuir el tiempo de análisis y evitar problemas de contaminación de blancos, la posibilidad de incluir una etapa de purificación se descarta.

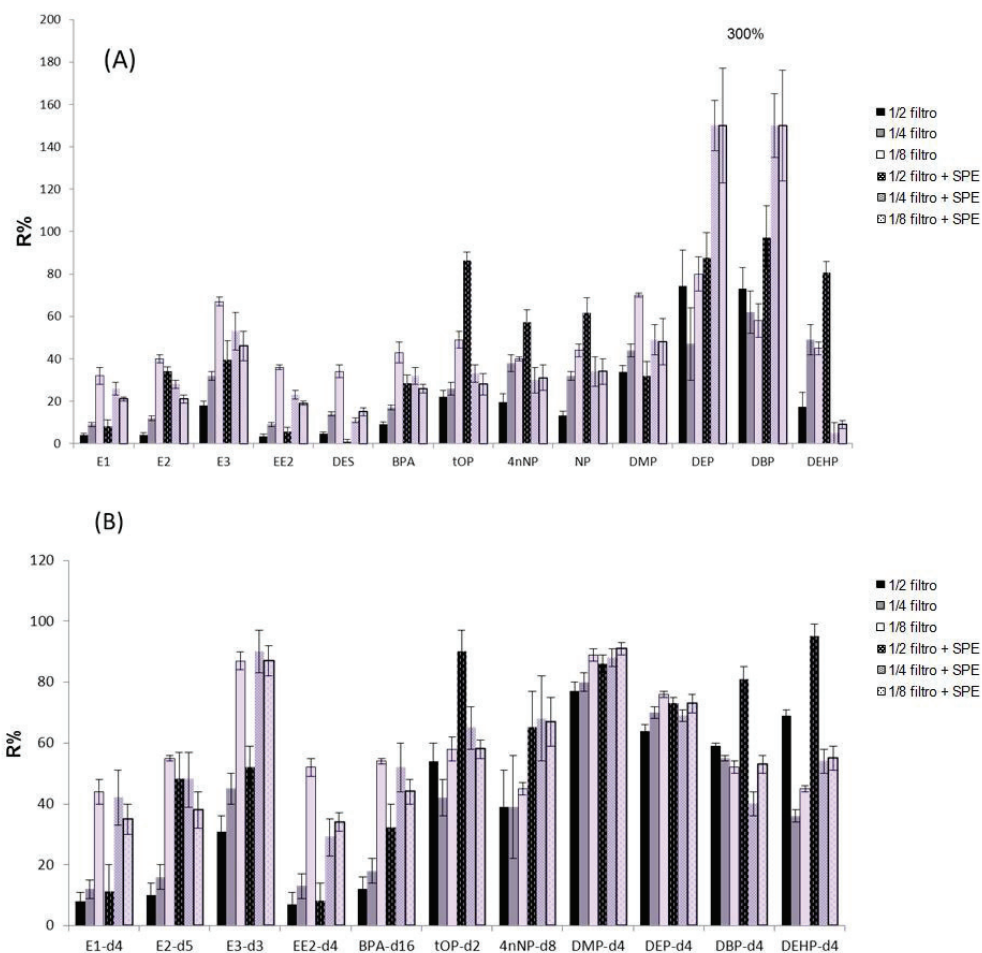


Figura 61. Recuperaciones absolutas de los compuestos bajo estudio (A) y de sus análogos deuterados (B) obtenidos en el estudio de cantidad de muestra y de la posible etapa de purificación mediante extracción en fase sólida (SPE) de los extractos de PLE

2.4. Estudio del efecto matriz

Para evaluar el efecto matriz se estudia la variación de la señal obtenida para cada compuesto con su concentración. En ausencia de efecto matriz, esta variación es proporcional; sin embargo, si el efecto es positivo o negativo se observa un aumento o supresión de la señal con la concentración, respectivamente.

Los filtros muestreados se sobrecargan con una concentración conocida de los compuestos bajo estudio y se extraen en las condiciones previamente comentadas. Del extracto final de 1 mL se toman tres alícuotas de 100 μ L; la primera alícuota se diluye

en proporción 1:10, la segunda en proporción 1:2 y la tercera se evapora a sequedad y se reconstituye con 100 μL de una disolución patrón de 500 ng/mL que contiene todos los compuestos. Así, las alícuotas presentan una concentración de 25 ng/mL, 125 ng/mL y 525 ng/mL, respectivamente.

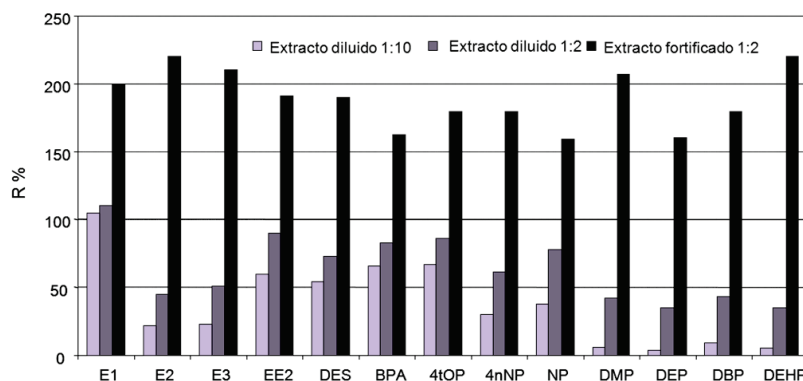


Figura 62. Estudio del efecto matriz

Como se muestra en la Figura 62, en el caso de los ftalatos no se observa influencia de la matriz; sin embargo, sí existe efecto matriz para los compuestos analizados en modo negativo (ESI-). Esto demuestra la importancia de utilizar patrones internos subrogados para corregir este efecto y asegurar así una cuantificación fiable de los compuestos bajo estudio.

2.5. Estudio de validación del método

Las condiciones finales del método PLE-LC-MS/MS son las siguientes: 1/8 de filtro se extrae con metanol a una temperatura de 50°C y presión de 1500 psi durante 3 min (2 ciclos). Los extractos de PLE se evaporan a sequedad y se redisuelven en 1 mL de metanol para su inyección en el LC-MS/MS, bajo las condiciones comentadas en la págs. 224-225 de este Capítulo.

El método analítico desarrollado se valida en términos de linealidad, exactitud, precisión y efecto matriz (Tabla 41). La cuantificación de los compuestos se lleva a cabo utilizando el análogo deuterado correspondiente como patrón interno subrogado, excepto en el caso del DES, que se cuantifica con el patrón deuterado de EE2. Dado que no existen materiales de referencia de estos compuestos en particulado atmosférico, la validación se realiza con muestras sobrecargadas. La señal obtenida en los blancos de procedimiento (n=3) se tiene en cuenta en cada ensayo.

Para establecer el rango lineal del método se realiza una recta de calibrado (n=11) el rango de concentraciones de 0,01 a 1000 ng/mL. La respuesta es lineal entre MQI y 500 ng/mL (lo cual equivale a una concentración de 55000 pg/m³ en particulado atmosférico), con coeficientes de determinación (r²) superiores a 0,9976 para todos los compuestos.

La exactitud y precisión (repetibilidad) del método para cada compuesto se determinan a dos niveles de concentración (1,17 ng/m³ y 0,23 ng/m³), de acuerdo con la Decisión de la Comisión 2002/657/CE [Decisión-2002/657] y tomando como referencia el límite máximo permitido para el benzo-(a)-pireno en la Directiva 2004/107/CE (1 ng/m³) [Directiva-2004/107]. Se han calculado las recuperaciones absolutas (AR%) y relativas (RR%) para cada compuesto: las AR% obtenidas varían entre 34-71%, excepto en el caso de los estrógenos (E1, E2 y EE2) que presentan recuperaciones absolutas menores del 30% debido al efecto matriz; en el caso de las RR% se obtienen valores satisfactorios para todos los compuestos (100 ± 20%). La DER (%) es inferior al 20% en todos los casos, lo que demuestra una buena precisión del método.

Tabla 41. Linealidad, límites de detección (MDL) y cuantificación (MQL), recuperaciones absolutas (RA%) y relativas (RR%) y desviación estándar relativa (DER%) para las dos concentraciones estudiadas

Compuestos	Linealidad (r ²)	MDL (pg/m ³)	MQL (pg/m ³)	Conc 1,17 ng/m ³			Conc 0,23 ng/m ³		
				DER	AR	RR	DER	AR	RR
E1	0,9976	4	11	15	25	92	2	22	117
E1-d ₄					26			19	
E2	0,9991	15	39	10	18	87	3	23	110
E2-d ₅					21			21	
E3	0,9986	7	18	5	59	99	2	47	92
E3-d ₃					60			53	
EE2	0,9988	31	83	7	16	80	7	26	92
DES	0,9987	7	18	10	22	97	3	26	109
EE2-d ₄					21			22	
BPA	0,9989	12	32	12	34	113	3	28	115
BPA-d ₁₆					27			23	
tOP	0,9996	24	63	7	36	88	5	37	78
tOP-d ₂					44			44	
4nNP	0,9985	17	45	7	19	86	14	22	96
NP	0,9985	8	22	15	32	107	15	26	116
4nNP-d ₈					27			19	
DMP	0,9994	9	24	8	55	75	15	42	77
DMP-d ₄					73			55	
DEP	0,9980	2	5	9	65	111	3	63	115
DEP-d ₄					58			55	
DBP	0,9980	7	20	14	71	121	15	77	99
DBP-d ₄					61			52	
DEHP	0,9997	10	26	10	46	93	11	46	88
DEHP-d ₄					53			60	

Los límites de detección (MDL) y cuantificación (MQL) del método se estiman experimentalmente mediante el análisis de muestras reales (filtros muestreados), como la concentración de analito que equivale a una relación señal/ruido (S/N) de 3 y 8, respectivamente. Debido a que la concentración de los compuestos puede variar en función de la muestra, se analizan muestras procedentes de diferentes zonas. Los límites, expresados como media de diez muestras, varían entre 5 pg/m³ (para el DEP) y 83 pg/m³ (para el EE2) lo que permite el análisis de los 13 EDCs en particulado atmosférico a niveles traza.

2.6. Aplicación a muestras

Tras los resultados satisfactorios obtenidos en el estudio de validación, el método se aplica al análisis de ocho muestras recogidas en diferentes zonas del área metropolitana de A Coruña (industrial, urbana y rural) para evaluar posibles fuentes de contaminación como pueden ser las emisiones industriales, las derivadas del tráfico o los aportes naturales.

La toma de muestra, pretratamiento y almacenamiento de los filtros es el comentado en las páginas 225-226 de este Capítulo. Las muestras de la zona industrial se recogen en el polígono de Sabón (latitud 43.32 °N, longitud 8.50 °W) durante 2004 y 2005; las de la zona urbana en la propia ciudad (latitud 43.38 °N, longitud 8.41 °W) en octubre del 2011 y las de la zona rural en el Instituto Universitario de Medio Ambiente de A Coruña (IUMA) situado en Oleiros (latitud 43.2 °N, longitud 8.17 °W) entre febrero y marzo del 2010.

Los resultados obtenidos demuestran la presencia de NP, DMP, DBP y DEHP en todas las muestras analizadas, debido a su utilización en aplicaciones industriales y domésticas. Este gran uso, sobre todo en la fabricación de plástico, justifica que para la mayoría de los EDCs las concentraciones obtenidas aumentan en sentido zona rural < zona urbana < zona industrial. Las hormonas E3, EE2 y DES no detectan en ninguna muestra; sin embargo, la presencia de E1 y E2 se detecta en alguna muestra del área industrial, lo que puede explicarse teniendo en cuenta los valores de la constante de Henry, menores para estos dos estrógenos (<3,7 E-011 atm/M). El hecho de que se haya detectado la presencia de alguna hormona en particulado atmosférico muestra la necesidad de más estudios centrados en esta cuestión, pues todavía no se dispone de datos suficientes para establecer conclusiones sobre la distribución de estos EDCs en aire ambiente.

En cuanto a los alquilfenoles, se observa un comportamiento diferente entre el isómero lineal y los ramificados. Así, el isómero lineal del nonilfenol (4-*n*-NP) no se detecta en ninguna muestra debido a su escaso uso industrial. Por su parte, el 4-tOP y el NP se determinan en todas las muestras analizadas; mientras que las concentraciones obtenidas para el 4-tOP son menores al MQL del método, las concentraciones del NP varían entre 252 y 760 pg/m³. Estos valores son un orden de magnitud menor que los medidos en áreas urbanas e industriales en las proximidades

del río Hudson (6,1 ng/m³) [Dachs y cols., 1999], pero mayores que las encontradas en distintas zonas de Alemania (0,040 ng/m³) [Xie y cols., 2006].

El BPA se determina únicamente en una muestra urbana, a una concentración de 107 pg/m³. Este valor es bastante más bajo que el obtenido en otros estudios; por ejemplo, se ha obtenido una concentración de BPA de 8 ng/m³ en las proximidades de una zona industrial, en donde el BPA se utiliza para la fabricación de dispositivos electrónicos [Sabatini y cols., 2005].

En el caso de los ftalatos, las concentraciones medidas son mayores en la zona rural que en la urbana. El DEP se determina sólo en muestras rurales e industriales, pero a concentraciones superiores a 1 ng/m³, mientras que el resto de ftalatos (DMP, DBP y DEHP) se observan en todas las muestras analizadas. Las concentraciones medidas para el DEHP (375-1259 pg/m³) son comparables con las encontradas en la literatura (0,005-1,03 ng/m³) [Xie y cols., 2006]. La concentración más alta se corresponde con la presencia de DBP en un área industrial (54676 pg/m³). Este valor es diez veces mayor que el medido en otros países como Grecia [Salapasidou y cols., 2011].

Una vez se conoce la presencia de los EDCs en el particulado atmosférico del área metropolitana de A Coruña se evalúa el daño que estos compuestos suponen para la población por la inhalación de dicho particulado. Debido a que todos ellos presentan propiedades de alteración endocrina, es interesante conocer el posible efecto conjunto que los EDCs tendrían sobre el organismo. Para ello se estima la actividad estrogénica de cada muestra en base a los equivalentes del 17-*beta*-estradiol (EEQ_t), de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$EEQ_i = C_i \times EEF_i$$

$$EEQ_t = \sum EEQ_i$$

donde *i* se refiere al compuesto de interés, *C_i* la concentración de dicho compuesto en la muestra y EEF es el factor de equivalencia del estradiol (EEF). Por su parte, los EEF se definen como el cociente entre el valor de EC₅₀ de un compuesto con respecto al valor de EC₅₀ del 17-*beta*-estradiol (siendo EC₅₀ la concentración a la cual se observan efectos en el 50% de la población). Los valores de EEF utilizados en este estudio, recogidos en la bibliografía y determinados mediante ensayos in vitro de ER-CALUX, varían entre 1E-007 (DBP) y 6E-004 (BPA) [Liu y cols., 2010; Zhang y cols., 2011].

Los valores de EEQ_t observados son similares en las tres áreas (varían de 0,349 a 0,48 pg/m³), registrándose la mayor concentración en el área urbana. El NP ha sido el compuesto que más ha contribuido a la actividad estrogénica (con más de un 90% del total en todos los casos), mientras que el grupo de ftalatos contribuyen con menos del 1%, pues a pesar de la alta concentración determinada su capacidad de alteración endocrina es menor.

De acuerdo con USEPA, se considera una cantidad de aire diaria inhalada de 6,8 m³/día para niños y 11 m³/día para adultos [EPA-1997], lo que da lugar a un nivel

de exposición diario de 3 pg/día y 5 pg/día para niños y adultos, respectivamente. Para evaluar si esta exposición supone un riesgo para las personas, y en ausencia de otro tipo de dato para realizar esta estimación, el resultado observado se compara con el valor de ingesta diaria aceptable recogido para el 17-*beta*-estradiol (3,5 µg/d) según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) [JECFA, 2000]. El valor obtenido experimentalmente es seis órdenes de magnitud menor que el establecido por la FAO; por tanto, no hay evidencias de que pueda existir un riesgo para los habitantes de A Coruña por inhalación de EDCs. Cabe destacar que estos resultados se corresponden con una primera estimación, por lo que sería necesario llevar a cabo más estudios a fin de establecer conclusiones más fiables sobre el riesgo que estos compuestos suponen para la salud.

3. ESTUDIO COMPARATIVO DE MÉTODOS DE ANÁLISIS

La metodología analítica propuesta es la primera encontrada en la bibliografía para el análisis simultáneo de estos 13 EDCs en particulado atmosférico (PM_{2,5}) mediante extracción con líquidos a presión seguida de determinación por cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem (PLE-LC-MS/MS). El uso de métodos de extracción sostenibles como la PLE permite reducir el gran volumen de disolvente utilizado y el elevado tiempo de análisis requerido por técnicas clásicas como la extracción Soxhlet [Dachs *y cols.*, 1999; Xie *y cols.*, 2006] o la extracción asistida por energía de ultrasonidos (US) [Berkner *y cols.*, 2004; Matsumoto *y cols.*, 2005; Sabatini *y cols.*, 2005; Saito *y cols.*, 2004]. Además, la selectividad del metanol como disolvente de extracción hace innecesaria una etapa posterior de purificación, llevada a cabo por algunos autores para eliminar interferentes que afectan a la determinación cromatográfica, debido a la complejidad del particulado atmosférico [Berkner *y cols.*, 2004; Salapasidou *y cols.*, 2011; Xie *y cols.*, 2006]. Por otra parte, la elección del LC-MS/MS como técnica instrumental, de elevada sensibilidad y selectividad, permite evitar la derivatización imprescindible cuando la mayoría de estos compuestos se determinan por GC-MS [Berkner *y cols.*, 2004; Dachs *y cols.*, 1999; Matsumoto *y cols.*, 2005; Saito *y cols.*, 2004]. Finalmente, este método permite el análisis de los EDCs a niveles traza, analizando una pequeña cantidad de muestra (1/8 de filtro). Otras ventajas del método propuesto son la automatización, la manipulación mínima de la muestra, la sencillez del proceso experimental y el bajo consumo de reactivos y generación de residuos de acuerdo con la Química Analítica Verde.

4. CONCLUSIONES

Se ha desarrollado y validado una metodología analítica basada en una extracción con líquido a presión (PLE-LC-MS/MS) para la determinación simultánea de 13 EDCs (alquilfenoles, bisfenol A, ftalatos y hormonas sexuales) en particulado atmosférico. Los parámetros de calidad analítica del método han sido satisfactorios, alcanzándose bajos límites de cuantificación utilizando una pequeña cantidad de muestra (1/8 filtro). Se trata de un método selectivo, sensible, rápido, sencillo, parcialmente automático y que no requiere una etapa de purificación previa a la determinación cromatográfica (reduciendo la cantidad de reactivos tóxicos y el tiempo de análisis, de acuerdo con los principios de la Química Analítica Verde), características por las que ofrece mejoras con respecto a la metodología existente en la bibliografía para el mismo fin. Por estos motivos, el método propuesto sería un buen candidato para incorporarse en programas de monitorización y control ambiental del aire, con el fin de asegurar la calidad del mismo y proteger la salud humana.

El método se ha aplicado satisfactoriamente al análisis de muestras de particulado atmosférico procedentes de zonas rurales, urbanas e industriales del área metropolitana de A Coruña. Compuestos como el NP, el DBP y el DEHP han sido determinados en el 100% de las muestras analizadas, lo que demuestra su ubicuidad en el medio y su importancia como contaminantes ambientales. Finalmente, y como una primera aproximación, se ha evaluado el riesgo que estos EDCs supondrían para los niños y adultos de las zonas bajo estudio por inhalación. La estimación llevada a cabo demuestra que no existe riesgo para la salud humana; sin embargo, sería necesario llevar a cabo más estudios sobre este aspecto, así como otros que consideren también otras vías de exposición, como la ingestión o el contacto dérmico, a fin de poder establecer una conclusión más precisa sobre el impacto de EDCs en la salud pública de los habitantes del área metropolitana de A Coruña.

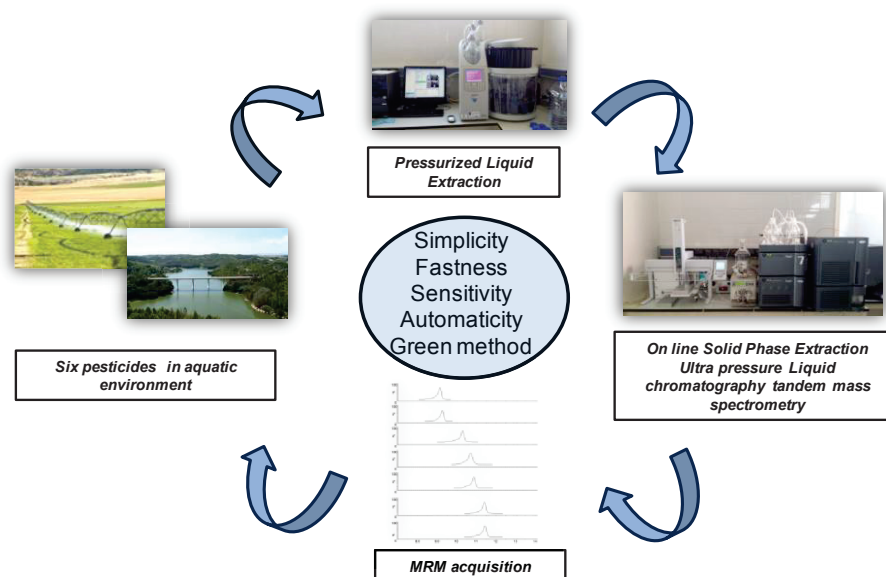
Bibliografía

- Becouze, C., Wiest, L., Baudot, R., Bertrand-Krajewski, J.-L., Cren-Olive, C. *Optimisation of pressurised liquid extraction for the ultra-trace quantification of 20 priority substances from the European Water Framework Directive in atmospheric particles by GC-MS and LC-FLD-MS/MS*, Anal Chim Acta (2011) 693, 47-53.
- Bergh, C., Torgrip, R., Östman, C. *Simultaneous selective detection of organophosphate and phthalate esters using gas chromatography with positive ion chemical ionization tandem mass spectrometry and its application to indoor air and dust*, Rapid Commun Mass Sp (2010) 24, 2859-2867.
- Berkner, S., Streck, G., Herrmann, R. *Development and validation of a method for determination of trace levels of alkylphenols and bisphenol A in atmospheric samples*, Chemosphere (2004) 54, 575-584.
- Dachs, J., Van Ry, D.A., Eisenreich, S.J. *Occurrence of Estrogenic Nonylphenols in the Urban and Coastal Atmosphere of the Lower Hudson River Estuary*, Environ Sci Technol (1999) 33, 2676-2679.

- Decisión de la Comisión de 12 de agosto de 2002 por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados. DOCE, L 221/8.
- Directiva 2004/107/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 115 de diciembre de 2004 relativa al arsénico, el cadmio, el mercurio, el níquel y los hidrocarburos aromático policíclicos en el aire ambiente. DOUE, L 23/3.
- EPA-1997, *Exposure Factors Handbook*, Environmental Protection Agency
- Fu, P., Kawamura, K. *Ubiquity of bisphenol A in the atmosphere*, Environ Pollut (2010) 158, 3138-3143.
- Heudorf, U., Mersch-Sundermann, V., Angerer, J.r. *Phthalates: Toxicology and exposure*, Int J Hyg Environ Health (2007) 210, 623-634.
- JECFA. *Toxicological Evaluation of Certain Veterinary Drug residues in Food*, WHO Food additives series: 43 (2000)
- Kuster, M., López, M.J., de Alda, M.J.L., Barceló, D. *Analysis and distribution of estrogens and progestogens in sewage sludge, soils and sediments*, TrAC -Trends Anal Chem (2004) 23, 790-798.
- LaFleur, A.D., Schug, K.A. *A review of separation methods for the determination of estrogens and plastics-derived estrogen mimics from aqueous systems*, Anal Chim Acta (2011) 696, 6-26.
- Liu, Y., Guan, Y.T., Tam, N.F.Y., Mizuno, T., Tsuno, H., Zhu, W.P. *Influence of Rainfall and Basic Water Quality Parameters on the Distribution of Endocrine-Disrupting Chemicals in Coastal Area*, Water Air Soil Poll (2010) 209, 333-343.
- Matsumoto, H., Adachi, S., Suzuki, Y. *Bisphenol A in Ambient Air Particulates Responsible for the Proliferation of MCF-7 Human Breast Cancer Cells and Its Concentration Changes over 6 Months*, Arch Environ Contamin Toxicol (2005) 48, 459-466.
- Olea Serrano, N., Fernández Cabrera, M.F., Martín Olmgeo, P. *Disruptores endocrinos. El caso particular de los xenobióticos estrogénicos II. Estrogénicos sintéticos*, Salud Ambiental (2001) 1, 64-72.
- Petrovic, M., Barceló, D., Díaz, A., Ventura, F. *Low nanogram per liter determination of halogenated nonylphenols, nonylphenol carboxylates, and their non-halogenated precursors in water and sludge by liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry*, J Amer Soc Mass Spectrom (2003) 14, 516.
- Petrovic, M., Solé, M., de Alda, M.J.L., Barceló, D. *Endocrine disruptors in sewage treatment plants, receiving river waters, and sediments: Integration of chemical analysis and biological effects on feral carp*, Environ Toxicol Chem (2002) 21, 2146-2156.
- Rudel, R.A., Dodson, R.E., Perovich, L.J., Morello-Frosch, R., Camann, D.E., Zuniga, M.M., Yau, A.Y., Just, A.C., Brody, J.G. *Semivolatile Endocrine-Disrupting Compounds in Paired Indoor and Outdoor Air in Two Northern California Communities*, Environ Sci Technol (2010) 44, 6583-6590.
- Sabatini, L., Barbieri, A., Violante, F.S. *Development and validation of a capillary high-performance liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometric method for the quantification of bisphenol A in air samples*, Rapid Commun Mass Sp (2005) 19, 3468-3472.
- Saito, I., Onuki, A., Seto, H. *Indoor air pollution by alkylphenols in Tokyo*, Indoor Air (2004) 14, 325-332.
- Salapatsidou, M., Samara, C., Voutsas, D. *Endocrine disrupting compounds in the atmosphere of the urban area of Thessaloniki, Greece*, Atmos Environ (2011) 45, 3720-3729.

- Salgueiro-González, N., López de Alda, M.J., Muniategui-Lorenzo, S., Prada-Rodríguez, D., Barceló, D. *Analysis and occurrence of endocrine-disrupting chemicals in airborne particles*, TrAC Trends Anal Chem (2015) 66, 45-52.
- UNE-EN 12341:1999: "Determinación de la fracción de PM10 de la materia particulada en suspensión. Método de referencia y procedimiento de ensayo de campo para demostrar la equivalencia de los métodos de medida al de referencia".
- Xie, Z., Selzer, J., Ebinghaus, R., Caba, A., Ruck, W. *Development and validation of a method for the determination of trace alkylphenols and phthalates in the atmosphere*, Anal Chim Acta (2006) 565, 198-207.
- Zhang, X., Gao, Y., Li, Q., Li, G., Guo, Q., Yan, C. *Estrogenic Compounds and Estrogenicity in Surface Water, Sediments, and Organisms from Yundang Lagoon in Xiamen, China*, Arch Environ Contam Toxicol (2011) 61, 93.
- Zhang, Z., Ren, N., Kannan, K., Nan, J., Liu, L., Ma, W., Qi, H., Li, Y. *Occurrence of Endocrine-Disrupting Phenols and Estrogens in Water and Sediment of the Songhua River, Northeastern China*, Arch Environ Contam Toxicol (2014) 66, 361-369.

CHAPTER IX. Analysis of selected pesticides in sediments and algae



- *Development and validation of two methodologies based on pressurized liquid extraction for the analysis of six pesticides in sediments and algae*
- *On line solid phase extraction coupled to ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry were selected as a clean-up and instrumental technique, respectively*
- *Satisfactory accuracy and precision were obtained as well as low method quantitation limits for all compounds*

Publicaciones científicas

“Pressurized liquid extraction followed by on line solid phase extraction clean-up and ultra pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry for the simultaneous determination of selected pesticides in sediments”. N.Salgueiro-González, A. Guimaraes, S. Muniategui-Lorenzo, M.F. Alpendurada. *En fase de redacción*

“Novel and automatic methodology for the simultaneous analysis of six pesticides in alga samples”. N.Salgueiro-González, A. Guimaraes, S. Muniategui-Lorenzo, M.F. Alpendurada. *En fase de redacción*

Pesticides have been extensively used all across the world for more than sixty years in agricultural, livestock, food industry, and domestic and environmental applications [Dagnac *y cols.*, 2005]. Their widespread presence in streams and rivers has been demonstrated in monitoring programmes throughout Europe in the last decades [Bottoni *y cols.*, 2013; Kreuger, 1998]. Consequently, possible negative impacts of these compounds on aquatic life and on human health should be taken into account.

In 2001, nine pesticides such as organochlorine and organophosphate compounds were included in the Stockholm Convention described as Persistent Organic Pollutants (POPs) because of their toxicity and ubiquity in the environment. Since then, further research was carried out in order to evaluate the effects of less-known groups of herbicides, fungicides and insecticides like triazines or pyrethroides. Nowadays, more studies about pesticides are carried on considering emerged compounds as well as a large number of pesticides metabolites [Rodríguez *y cols.*, 2013]. For all these reasons, analytical methodologies for the simultaneous determination of new pesticides at low environmental levels are required.

Taking into account the current situation in pesticides analysis, an interesting research focused on the occurrence and distribution of different groups of pesticides (fungicides, herbicides and insecticides) in the Mondego River (Portugal) is carried out by the Department of Life Sciences, Centre for Functional Ecology, University of Coimbra in collaboration with Water Institute of the Northern Region (IAREN). The aim of this study is to evaluate the ecological impact of these pesticides (some of them well-known endocrine disrupting compounds) in the studied area, where they are frequently used in agricultural activities. In order to achieve this objective, water, sediment and different species of biota, algae and aquatic plants are considered. This short stay was focused on sediments and alga species such as *Ulva spp.* (Linnaeus, 1753), *Gracilaria gracilis* (Stackhouse, 1801) and *Fucus vesiculosus* (Linnaeus, 1753) were addressed.

The development and validation of two fast, sensitive, selective and automatic analytical methodologies for the determination of six selected pesticides in sediments and algae are detailed in this Chapter. Furthermore, these methodologies were applied to the analysis of samples collected in Mondego River to have a first picture of the presence and distribution of these pollutants in the studied area as well as to contribute to understand their behaviour in the aquatic environment.

1. INTRODUCTION

1.1. Target compounds

Pesticides represent a wide category of inorganic and organic chemicals which are intentionally applied in agricultural ecosystems with the aim to cause adverse effects on harmful animals, insects, plants, weeds, bacteria and fungi in order to limit their diffusion and inhibit their growth and survival [Bottoni *y cols.*, 2013]. These compounds can easily enter into the water system, especially in surface waters during rain events, when they are mobilized and transported with runoff and with the pathway through groundwater [Doppler *y cols.*, 2014]. In soils and sediments, the fate of pesticides is controlled by chemical, biological and physical dynamics of this matrix (Figure 63) which affect their persistence (chemical and microbial degradation) and their mobility (sorption, plant uptake, volatilization, wind erosion, run-off and leaching).

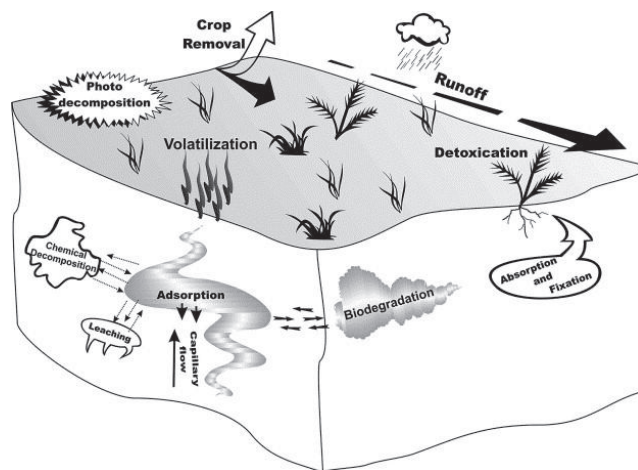


Figure 63. Fate of pesticides residues in sediments [Andreu *y cols.*, 2004]

Furthermore, and taking into account their physical and chemical properties, pesticides could cause instantaneous effects and long-term effects as bioaccumulation and biomagnifications through the food web [Carafa *y cols.*, 2007]. Consequently, and in order to preserve the aquatic environment and protect wildlife and plantlife, these pollutants should be considered in environmental and ecotoxicological studies based on the different levels of food chain, including algae.

In this work six pesticides are considered (Figure 64): one fungicide (azoxystrobin), four herbicides (atrazine, terbuthylazine, bentazone and penoxsulam) and one insecticide (lambda-cyhalothrin). The selection of the representative compounds of each group has been carried out considering their toxicity and their possible occurrence in the studied area taking into account their use and applications [ERSAR-2014].

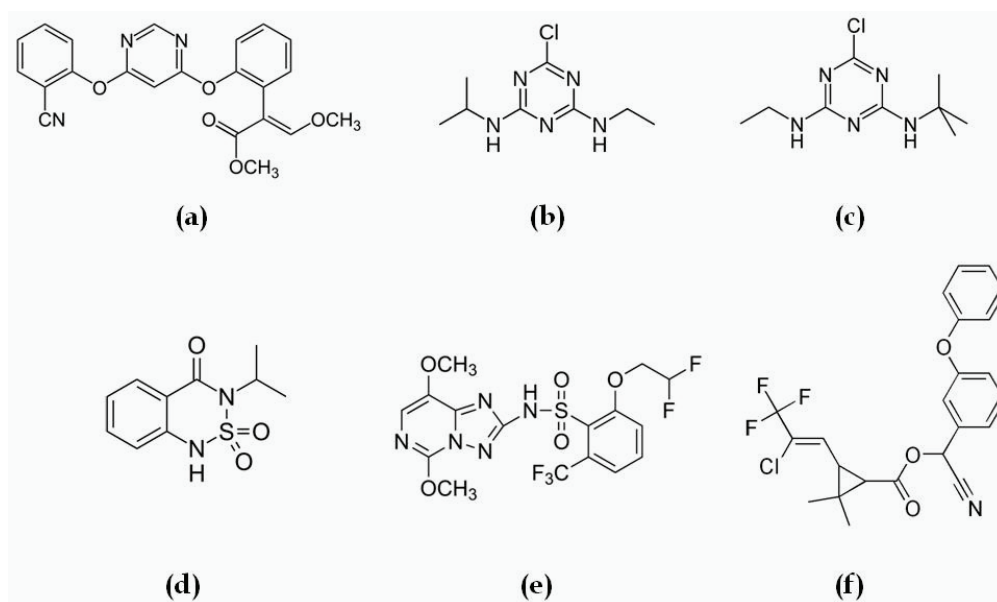


Figure 64. Pesticides considered in this study: (a) azoxystrobin, (b) atrazine, (c) terbuthylazine, (d) bentazone, (e) penoxsulam and (f) lambda-cyhalothrin

Azoxystrobin is a well-known fungicide used for control soil-borne and foliar diseases in more than 85 different crops [Rodríguez *y cols.*, 2013]. This compound entered primarily in the German market in February 1996 and nowadays is contained in brands which are the world's n°1 fungicides by Syngenta [Syngenta-2010]. Moreover, different European studies suggested that azoxystrobin is one of the most common pesticides found in rice and foodstuffs [Rodríguez *y cols.*, 2013]. European Food Safety Authority considered that this fungicide and its formulations are very toxic to aquatic organisms, causing long-term adverse effects in aquatic environment [EFSA-2010]. Its impact in aquatic plants and algae was also demonstrated [Liu *y cols.*, 2015].

Triazines are a group of herbicides that are present in the ten most-used European herbicides formulations [Rodríguez-González *y cols.*, 2015]. These compounds have been extensively employed to provide pre- and post-emergence of grasses, crops and many weeds in cereals [Wang *y cols.*, 2010]. Atrazine is a well-known endocrine disrupting compound (EDC) and, for this reason, it is included in the list of 45 priority substances in water policy according with Directive 2013/39/EU [Directive-2013/39/UE]. Environmental Quality Standards (EQS) of 0.6 and 2 µg/L for annual average (AA) and maximum allowable concentration (MAC) respectively were established for atrazine in waters by this Directive; however, an EQS value for biota has not been set yet. Because of its toxicity, atrazine was banned in some countries and controlled in other ones to preserve the environment and protect public safety. As a consequence of this situation, the use of terbuthylazine in European agriculture started to increase [Mercandante *y cols.*, 2013]. The toxicity and persistence of this pesticide in water, soils and organisms was proved [Wang *y cols.*, 2010]; however, at this moment, this compound is not considered as an EDC because of the absence of data [Ewence *y cols.*, 2015].

Bentazone is an herbicide used in farming worldwide for controlling sedges and broad-leaf weeds in corn fields, rice paddies and other intensive crops [Cañero *y cols.*, 2012]. Its wide use was demonstrated by Loos et al. (2010), when bentazone was considered one of the most important contaminants in terms of frequency of detection and maximum concentrations in ground waters from 23 European countries [Loos *y cols.*, 2010]. Furthermore, this pesticide poses environmental concern because of its high mobility, persistence and susceptibility to leaching from soil to groundwater [Rodríguez-Cruz *y cols.*, 2008].

Penoxsulam is another herbicide (sulphonamide herbicide) used for the post-emergence control of annual grasses, sedges and broadleaf weeds in rice cultivation. This pesticide is dissipated rapidly in water (photo-degradation process) and soils (microbial degradation as a predominant process); however, it is particularly toxic to aquatic plants, including algae [Tsochatzis *y cols.*, 2013].

Among all insecticides, lambda-cyhalothrin is selected as representative of synthetic pyrethroids insecticides. The chemical structure of pyrethroids is based on naturally occurring pyrethrins [Saillenfait *y cols.*, 2015]. These compounds are commonly used in agronomics both on crops and directly over the grain to store, in veterinary on cattle and pets, as domestic insecticides and even for health purposes against scabies, lice or vectors of some diseases such as malaria or typhus [Corcellas *y cols.*, 2015]. Pyrethroids exhibit relatively lower mammalian toxicity than organophosphates pesticides; however, some studies have identified PYRs as potential human neurotoxicants that may cause developmental neurotoxic and immunotoxic effects [Van Emon *y cols.*, 2012]. Furthermore, the endocrine potential of this compound is still in question because of the absence of data [Ewence *y cols.*, 2015]. On the other hand, although pyrethroid persistence is usually lower than 90 days [AERU-2011], these compounds are found in environmental samples because of their excessive use.

For all the reasons commented before, further research about the fate, distribution and bioaccumulation of these six selected pesticides in the environment is required.

Physical and chemical characteristics of the target pesticides are shown in Table 42. As it can be seen, bentazone and penoxsulam are most polar pesticides ($\log K_{ow} < 0$) whereas lambda-cyhalothrin is the most apolar one ($\log K_{ow} > 5$). Consequently, these two herbicides tend to appear in water phase while the rest of pesticides can be associated in sediments and bioaccumulated in organisms and aquatic plants. Some pesticides such as lambda-cyhalothrin, atrazine and terbuthylazine are considered volatile compounds (Henry constant lower than 10^{-5}) while the volatility of azoxystrobin and penoxsulam is very limited.

Table 42. Physic-chemical characteristics of the target compounds [AERU-2011]

Compound	CAS number	MW	Water solubility 20°C(mg/L)	log K _{ow}	K _{oc}	Henry constant (atm/M)
Azoxystrobin	131860-33-8	403.40	6.7	2.5	589	7.4E-09
Atrazine	1912-24-9	215.68	35	2.7	100	1.5E-04
Terbutylazine	5915-41-3	229.71	6.6	3.4	-	3.4E-03
Bentazone	25057-89-0	240.28	570	-0.46	51	7.2E-05
Penoxsulam	219714-96-2	483.37	408	-0.60	73,2	2.5E-11
Lambda-cyhalothrin	91465-08-6	449.85	0.005	5.5	283707	2.0E-02

1.2. Previous analytical methodologies for the determination of target pesticides

Some of the target pesticides such as triazines (atrazine and terbutylazine) and pyrethroids (lambda-chyalthrin) have been studied in the last decades because of their widely use in different applications and their toxicity. However, other pesticides like azoxystrobin, bentazone and penoxsulam have been scarcely considered and consequently, their presence and distribution in the environment as well as their human health impact are still unknown. For these reasons, new methods based on this aim are needed.

Gas chromatography coupled to electron capture detector (EDC), mass spectrometry (MS) and tandem mass spectrometry (MS/MS) were most common instrumental techniques for the simultaneous determination of selected pesticides in solid matrices [Barr *y cols.*, 2002]. However, liquid chromatography coupled to UV/Vis detector, MS and MS/MS were also used for this aim, in order to avoid the derivatization step, reducing the analysis time and preventing losses of analytes. In this work, ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS); this technique, developed for the first time in 2004, is based on the use of columns packed with smaller particles and/or higher flow rates for increased speed, with superior resolution and sensitivity [Swartz, 2005].

Regarding the extraction procedure, classic techniques such as Soxhlet [USEPA-1996] and ultrasound-assisted extraction (US) [Tadeo *y cols.*, 2010] were chosen for the analysis of these pesticides in solid samples. Other techniques like microwave assisted extraction (MAE) [Kalogridi *y cols.*, 2014], Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QueCHERS) [Pang *y cols.*, 2015] and matrix solid phase dispersion (MSPD) extraction [Rodríguez-González *y cols.*, 2015] were also applied in the last years. Pressurized liquid extraction (PLE) introduces lots of advantages in comparison to these other solid-liquid extraction techniques: selectivity, automaticity, low analysis time and low consume of toxic reagents (according to Green Chemistry

principles) are some of them. Consequently, in this work PLE were selected for the extraction of the target compounds in sediment and alga samples.

In order to have a first picture about the use of this technique in pesticide analysis in these matrices, some researches based on sediments analysis and found in the literature between 2005 and 2015 (ScienceDirect) are reviewed in Table 43. PLE characteristics, instrumental determination and analytical parameters of each methodology are summarized. In the case of algae and as far as we know, no previous works focused on PLE extraction of selected pesticides could be found in the literature. Furthermore, and taking into account few works about this issue were previously published, development and application of these method seems to be interesting.

As it can be seen, a clean-up step is frequently added to the experimental procedure because of the matrix complexity. Different solid-phase extraction sorbents, such as Florisil® [Mekebri *y cols.*, 2008; Navarro-Ortega *y cols.*, 2010] and alumina [Masiá *y cols.*, 2015; Villaverde *y cols.*, 2008], and SPE cartridges (Oasis HLB® [Köck-Schulmeyes *y cols.*, 2013; Wick *y cols.*, 2010] and primary secondary amine combined with graphitized carbon (PSA/GCB) [You *y cols.*, 2010]) were used for the clean-up of PLE extracts. Gel permeation chromatography (GPC) [Mekebri *y cols.*, 2008], stir bar sorptive extraction (SBSE) [Camino-Sánchez *y cols.*, 2011] and QuEChERS extraction [Chiaia-Hernández *y cols.*, 2013] were also employed. In general, these clean-up steps require long extraction times and large volume of toxic solvents; to improve these disadvantages, in this study on-line solid phase extraction (on-line SPE) was selected as a clean-up technique.

Table 43. Analytical methods for target pesticides determination in soils/sediments using PLE (2005–2015, ScienceDirect). Characteristics and analytical parameters. (NM=no mentioned)

Pesticides	Matrix	PLE characteristics	Clean-up	Instrumental technique	R%	MDL (ng/g dw)	Ref
Atrazine	Soil (15 g)	Extraction with acetone, 50°C and 100 atm during 3 min (3 cycles)	-	GC-MS/MS	85	1.9	[Dagnac <i>y cols.</i> , 2005]
Lamba-cyhalothrin	Sediment (10 g)	Extraction with acetone:dichlorometane, 100°C and 1500 psi . 7g Hydromatrix®	GPC + Florisil® (25 g)	GC-ECD	87-104	1	[Mekebri <i>y cols.</i> , 2008]
Atrazine	Soil (5g)	Extraction with water:acetonitrile (1:2 v/v), 140°C and 110 bar during 2 min (3 cycles) . 1g silica as dispersant agent	-	LC-MS	89-100	12	[Leseur <i>y cols.</i> , 2008]
Atrazine, terbutylazine	Sediment (1 g)	Extraction with hexane:acetone (1:1 v/v), 100°C and 1500 psi during 5 min (2 cycles)	In cell : Alumina (7g)	GC-MS	108-128	NM	[Villaverde <i>y cols.</i> , 2008]
Atrazine, terbutylazine	Sediment (NM g)	Extraction with hexane:DCM (1:1 v/v), 100°C and 1500 psi during 10 min (1 cycles). 5 g Florisil® as dispersant agent	In cell: Florisil® (2g)	GC-MS	NM	NM	[Navarro-Ortega <i>y cols.</i> , 2010]
Atrazine, terbutylazine	Sediment (5 g)	Extraction with acetone:methanol (1:1 v/v), 50°C, 1500 psi	SPE. Carbohydrate-Clean-Columns	LC-MS	70	NM	[Ricart <i>y cols.</i> , 2010]
Terbutylazine,	Sludge (200 mg)	Extraction with water:methanol (1:1 v/v), 80°C during 10 min (4 cycles)	SPE. Oasis HLB®	LC-MS/MS	55	2.5	[Wick <i>y cols.</i> , 2010]
Lamba-cyhalothrin	Sediment (NM g)	Extraction with acetone:DCM (1:1 v/v), 100°C, 1500 psi, 2 cycles	SPE. GCB/PSA	GC-MS	74-83	0.83	[Wang <i>y cols.</i> , 2010]

Table 43. Analytical methods for target pesticides determination in soils/sediments using PLE (2002-2015, ScienceDirect). Characteristics and analytical parameters (NM=nomentioned)

Pesticides	Matrix	PLE characteristics	Clean-up	Instrumental technique	R%	MDL (ng/g dw)	Ref
Lamba-cyhalothrin	Sediment (5 g)	Extraction with acetone:DCM (1:1 v/v), 100°C and 2000 psi during 5 min. 10g Na ₂ SO ₄ + 10 g sand	SPE. PSA/GCB	GC-MS	75-117	0.54	[You y cols., 2010]
Atrazine, terbuthylazine	Sediment (10 g)	Extraction with methanol, 80°C, 1000 psi during 10 min	SBSE	TD-GC-MS	77	0.64	[Camino-Sánchez y cols., 2011]
Atrazine, terbuthylazine, bentazone	Sediment (5 g)	Extraction with acetone:DCM (1:1 v/v) + 1% formic acid, 100°C and 100 bar during 5 min (2 cycles). 6g alumina + sand	SPE. Oasis HLB®	LC-MS/MS	112	0.16	[Köck-Schulmeyer y cols., 2013]
Terbuthylazine	Sediment (5g)	Extraction with acetone + 0.02% TFA, 100°C, 100 bar during 5 min (3 cycles)	NIP-HPLC	GC-MS	NM	NM	[Regueiro y cols., 2013]
Azoxystrobin, atrazine, terbuthylazine, bentazone	Sediment (4-6g)	Extraction with ethylacetate:acetone (70:30 v/v), 80°C. Diatomaceous earth as dispersant agent (0.25 g)	QuEChERS	LC-MS	69-109	0.13-0.95	[Chiaia-Hernández y cols., 2013]
Penoxsulam	Soil (2.5 g)	Extraction with acetonitrile. 5g alumina + sand	-	HPLC-DAD	NM	NM	[Tsochatzis y cols., 2013]
Atrazine, terbuthylazine	Sediment (1 g)	Extraction with acetonitrile, 100°C, 1500 psi during 5 min	In-cell: 5 g acid alumina	LC-MS/MS	68-93	3-5	[Masía y cols., 2015]

On line-SPE is an automatic technique which offer increased sensitivity with reduced sample handling as all the extracted compounds can easily be introduced to the LC column, reducing the exposure to hazardous solvents [Arroyo-Mazaneres *y cols.*, 2015]. Figure 65 shows a common SPE-LC system with one SPE column and two pumps. The loading pump transfers the injected sample onto the SPE column. Non-retained compounds are transferred to waste while analytes are trapped. The analytical pump subsequently elutes the analytes to the LC column [Rogeberg *y cols.*, 2014].

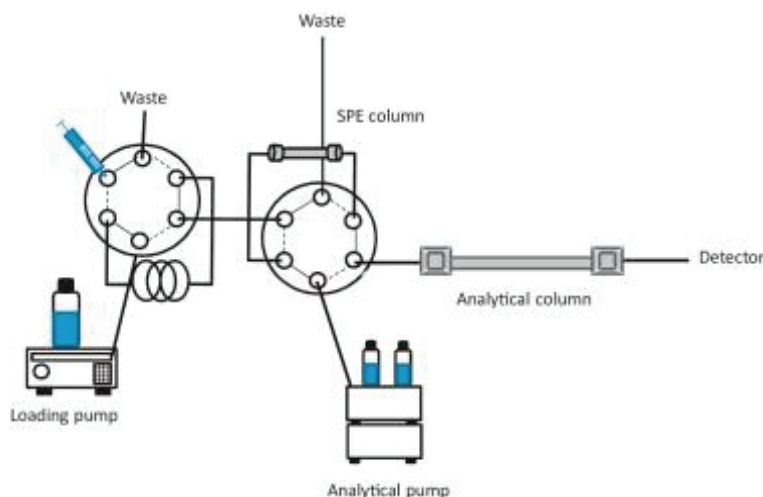


Figure 65. Common on-line SPE-LC system with two pumps (loading and analytical pumps) [Rogeberg *y cols.*, 2014]

Different factors are crucial for a successful analysis: analyte features (polarity, charge, functional groups), ability of stationary phase to trap and separate analytes, sample composition, injection volume, loading volumes and compatibility between the SPE and LC step conditions [Rogeberg *y cols.*, 2014].

The main advantages of on-line SPE coupled to LC are high sample throughput, minimal solvent utilization, fast sample preparation and small sample volumes needed (5-40 mL) [Bones *y cols.*, 2006]. Consequently, different methods based on on-line SPE coupled to LC-MS technique for the analysis of pesticides [Hurtado-Sánchez *y cols.*, 2010], or pharmaceutical residues [Bones *y cols.*, 2006] in water samples were published in the last years. Furthermore, on-line SPE was also employed in the analysis of PAHs [Ericsson *y cols.*, 2002] and organochlorine pesticides [Chen *y cols.*, 2007] in solid matrices, as a clean-up step. However, as far as we know, no previous works based on the analysis of selected pesticides in solid matrices using on-line SPE can be found in the literature. Some limitations are, up to now, the relatively high sample loading flow (5-20 mL/min) and the run time per analysis was higher than 30 min [Hurtado-Sánchez *y cols.*, 2010].

2. DEVELOPMENT OF TWO NOVEL, GREEN AND AUTOMATIC ANALYTICAL METHODOLOGIES FOR SELECTED PESTICIDE DETERMINATION

These two proposed analytical methodologies are based on three main steps: 1) pressurized liquid extraction of sediment samples or selective pressurized liquid extraction of alga samples employing methanol as a extraction solvent, 2) on-line solid phase extraction of PLE aqueous extract (dilution 1:20) using Oasis HLB® columns and 3) ultra performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry for the determination of the target analytes. Due to the fact that on-line SPE and UPLC-MS/MS characteristics are common to both methodologies, these steps are commented before at the beginning of this section. After that, PLE (or SPLE) development assays, validation study and application to real samples of each methodology are detailed.

2.1. Chemicals and analytical instrumentation

Azoxystrobin 99.4% purity ($\pm 0.5\%$ tolerance), terbuthylazine 98.8% purity ($\pm 0.5\%$ tolerance), penoxsulam 96.9% purity ($\pm 1\%$ tolerance) and lambda-cyhalothrin 97.8% purity ($\pm 0.5\%$ tolerance) were obtained from Fluka Analytical (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), and atrazine 99.1% ($\pm 0.5\%$ tolerance) and bentazone 99.7% ($\pm 0.5\%$ tolerance) were purchased from Riedel-de Haën (Seelze, Germany). Standard solutions containing all the compounds (1000, 10 and 1 mg/L) were prepared in methanol Chromasolv® HPLC-grade from Sigma Aldrich (Steinheim, Germany).

Chromatographic separation was performed with an Acquity UPLC pump from Waters using an ACQUILITY UPLC® HSS T3 column (2.1 x 150 mm, 1.8 μ m). For mobile phase preparation, methanol Chromasolv® HPLC-grade and ammonium acetate were from Sigma Aldrich (Steinheim, Germany) and ultrapure water purified in a Direct MilliQ water system (Millipore, Bedford, MA, USA) were employed. MS/MS detection was performed by a TQD triple-quadrupole mass spectrometer from Waters equipped with an electrospray (ESI) interface working in both positive and negative ion modes along the analytical run. Instrumental control, data acquisition and evaluation were carried out using MassLynx 4.0 software (Waters).

An accelerated extraction solvent system ASE® 350 instrument from Dionex (Thermo Fischer Scientific Inc., Sunnyvale, California, USA) with stainless steel cell (5 mL) sealed both ends with cellulose filters were employed for PLE extraction. Diatomaceous earth, Dionex ASE™ Prep., also from Thermo Scientific was selected as a dispersant agent. For in-cell clean-up assays, neutral alumina grade I, basic alumina, Florisil®, silice and primary secondary amine (PSA) were obtained from Supelco (Bellefonte, PA, USA). Methanol, acetonitrile and acetone used for the SPLE optimization assays were purchased from Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). For

clean-up step, on-line SPE system with Oasis[®] HLB Direct Connect HP 20 μ m Columns (2.1 x 30 mm) was from Waters.

2.2. Ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) methodology

The UPLC-MS/MS methodology employed in this study forms part of an internal standardized protocol established in the Water Institute of the Northern Region of Portugal (IAREN). Chromatographic separation was performed using a gradient elution with methanol and water (both with 5 mM of ammonium acetate) as a mobile phase at a flow rate of 0.3 mL/min. The 12-min gradient started with 5% of methanol in water, increased to 100% methanol in 5 min and continued in this percentage during 3 min. Then, it readjusted to the initial conditions in 2 min, and equilibrated for further 2 min. The injection volume was set to 30 μ L.

Azoxystrobin, atrazine and terbuthylazine were detected in positive ionization mode (PI) whereas negative ionization mode (NI) was employed for bentazone, penoxsulam and lambda-cyhalothrin determination. The relevant instrumental conditions for the spectrometric determination of each compound are shown in Table 44. Other important parameters were as follows: capillary voltage, 3500 V; source temperature, 140°C; desolvation temperature, 350°C; extractor voltage, 3V; RF lens, 0.2 V. Nitrogen was used as nebulizing and desolvation gas.

Table 44. Retention times and MS/MS characteristics of the target pesticides

Pesticide	ESI	t_R (min)	Precursor ion (m/z)	Product ions (m/z)	Cone (V)	Collision energy (eV)	MRM ratio
Azoxystrobin	PI	6.64 \pm 0.5	404 (M+H)	372 , 329	34	16, 34	5.5 \pm 0.7
Atrazine	PI	6.36 \pm 0.5	216 (M+H)	174 , 103	42	22, 32	1.7 \pm 0.3
Terbuthylazine	PI	6.50 \pm 0.5	230 (M+H)	174 , 78	38	18, 28	5.7 \pm 0.9
Bentazone	NI	4.66 \pm 0.5	239 (M-H)	133 , 175	50	18, 24	4.9 \pm 1.0
Penoxsulam	NI	5.30 \pm 0.5	481 (M-H)	179 , 81	60	24, 32	2.7 \pm 0.4
Lambda-cyhalothrin	NI	7.76 \pm 0.5	448 (M-H)	420 , 385	16	6, 10	-

Multiple-reaction monitoring (MRM) was chosen as a data acquisition mode because of its sensitivity and selectivity. At least of four identification points (one precursor ion and two product ions) were recorded for the identification and confirmation of each target compounds according to the European Decision 2002/657/EC [Decision-2002/657/EC]. Retention times and MRM ratios were used as criteria for the identification of compounds to avoid false positive results and overestimations.

2.3. On-line SPE conditions: clean-up step

In this work, a commercial SPE-LC system with two SPE columns was employed; in this way, a reduction in the analysis time was achieved because of the simultaneous clean-up in SPE column1 and the conditioning of SPE column2. All the stages of this procedure are shown in Figure 66.

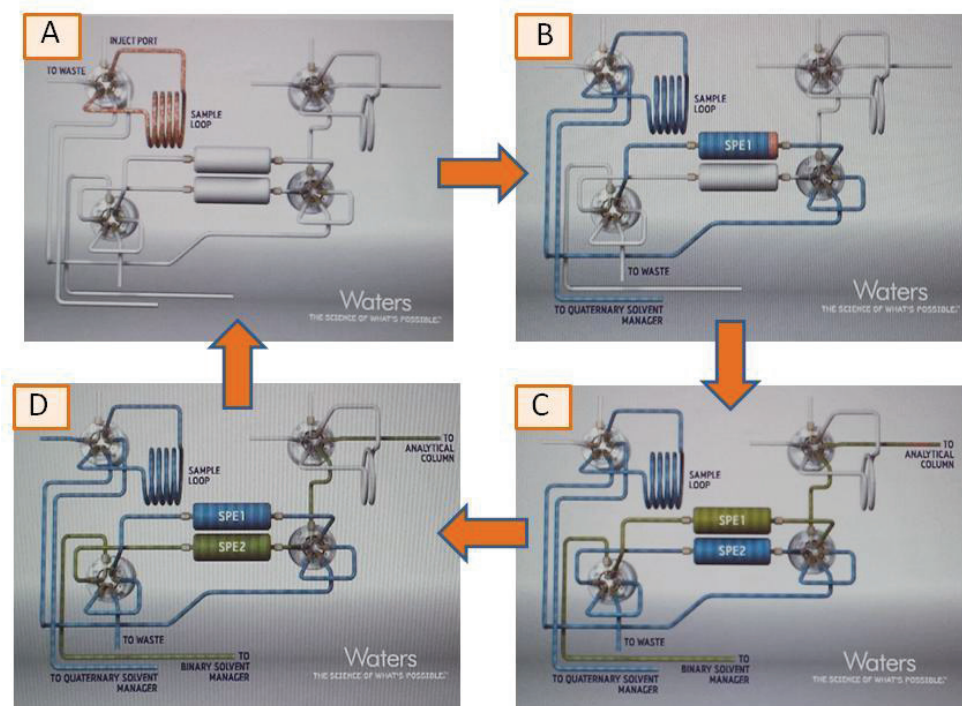


Figure 66. Stages of the SPE-LC system using in this study: (A) sample injection; (B) loading onto the SPE1; (C) elution with LC mobile phase (SPE1) and conditioning of SPE2 with water:methanol (95:5 v/v) and (D) separation in LC column (SPE1) and loading onto the SPE2

After the SPE column1 was conditioned with a solution of ultrapure water and methanol (95:5 v/v) during 12 min, 5 mL of PLE extract (dilution 1:20) was loaded onto the SPE column1 at a flow rate of 1 mL/min using a 5 mL syringe and a 5 mL loop. Analytes were retained on the SPE column1, matrix interferences were flushed to waste and the SPE column2 was simultaneous equilibrated (12 min). Then the target analytes adsorbed on the SPE column1 were eluted by the mobile phase composition used in the LC separation. In the next step and whereas the analytes were isolated in the analytical column, the valve was switched back to the loading position after 12 min to load the next sample onto the on-line SPE column2 (1 mL/min). The temperature of SPE columns were 40°C.

2.4. Extraction of sediment samples

2.4.1. Optimization of PLE parameters

The PLE efficiency can be affected by different parameters such as solvent extraction, temperature or extraction time. For the optimization assays, sediment samples collected in a pristine area (where no target pollutants are expected) were used. After collection, samples were frozen at -20°C , homogenised and sieved by 1 mm in the laboratory.

One gram of sediment sample were mixed with 0.2 g of diatomaceous earth (dispersant agent) until homogenization, spiked with a small amount of standard solution at a concentration level of 50 ng/g dw for all compounds and placed into the PLE cell for 2 hour in order to achieve more realistic interactions between analytes and matrix.

PLE parameters were optimized using a univariate approach. The first parameter considered was the solvent extraction ($n=3$): methanol, acetonitrile, and a mixture acetone:methanol (50:50 v/v) were tested taking into account previous works found in the literature [Camino-Sánchez *y cols.*, 2011; Ricart *y cols.*, 2010; Tsochatzis *y cols.*, 2013]. Other PLE variables were selected according previous experience as follows: temperature, 60°C ; pressure, 1500 psi; static time, 3 min; number of cycles, 4; flush, 60% and purge, 60 s. PLE extracts (1 mL) were evaporated under nitrogen steam until dryness and re-dissolved in 1 mL of the organic solvent used in the LC mobile phase (methanol with 5 mM ammonium acetate).

As it can be seen in Figure 67, low recoveries ($R\% < 20\%$) were obtained with the three solvents probably because of a high matrix effect. However, methanol was chosen as a solvent extraction because of the lower relative standard deviation observed ($< \text{RSD}\%$) as well as the higher availability of solvent.

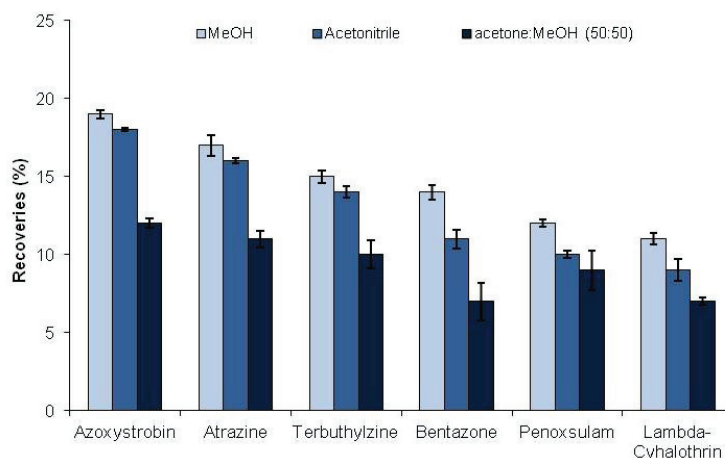


Figure 67. Selection of the solvent extraction ($n=3$)

The influence of the temperature in the extraction step was also studied ($n=3$). Temperatures between 60 and 100°C were assayed (Figure 68). Recoveries increased and relative standard deviation decreased with higher temperature. However, a decrease in recoveries was shown at temperatures higher than 80°C which can be explained by a possible degradation of compounds. For these reasons, the selected temperature was 80°C.

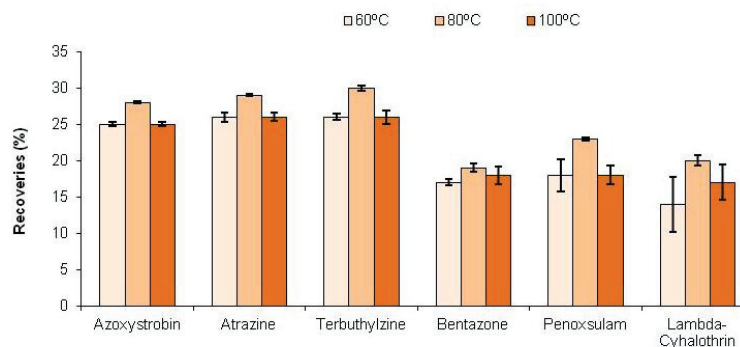


Figure 68. Study of the extraction temperature ($n=3$)

To improve the results (recoveries~25%) and to reduce matrix effects, a clean-up step was added to the experimental procedure in a new set of experiments ($n=3$). Different clean-up techniques were tested (Figure 69): in-cell clean-up with Florisil®, on-line SPE with Oasis® HLB columns and the combination of both techniques (Florisil® + on-line Oasis® HLB). For the first one, 0.5 g of Florisil® was placed at the bottom of the PLE cell. Then, the mixture sediment sample and dispersant agent (ratio 4:1) were also introduced; in this way, simultaneous extraction and clean-up could be carried out. For the on-line SPE clean-up, 1 mL of the PLE extract was diluted to 20 mL with ultrapure water; the aqueous extract was injected in the on-line SPE-UPLC-MS/MS system, as it was explained in sub-section 2.3 (flow rate of 1 mL/min; temperature, 40°C).

Low recoveries ($R\% < 40\%$ for all compounds) were observed with in-cell Florisil® clean-up in comparison to the other procedures. Better results ($R\% > 60\%$) were obtained with on-line SPE and in-cell clean-up following by on-line SPE, except in the case of lambda-cyhalothrin which seemed to be retained in Florisil® ($R\% < 40\%$). Consequently, and in order to minimize the use of toxic reagents, on-line SPE with Oasis® HLB was selected as a clean-up technique.

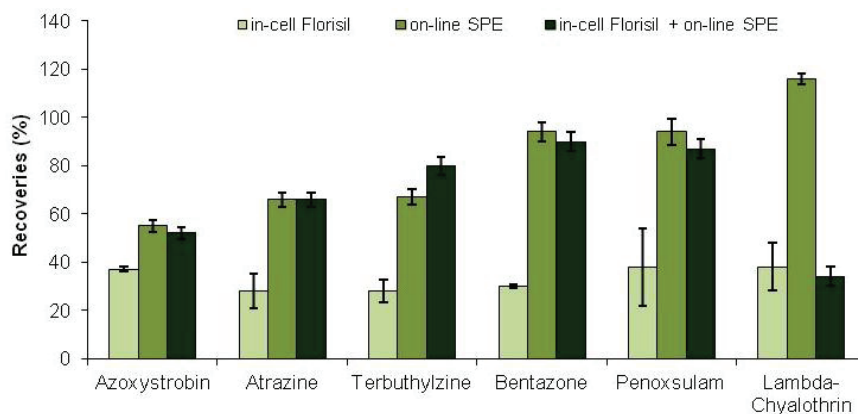


Figure 69. Techniques assayed for the clean-up procedure (n=3)

Final conditions of the PLE-on-line SPE-UPLC-MS/MS procedure are summed up in the following lines: solvent extraction, methanol; pressure, 1500 psi; temperature, 80°C; static time, 3 min; number of cycles, 4; dispersant agent, diatomaceous earth (0.20 g), clean-up, on-line SPE using Oasis® HLB and a flow rate of 1 mL/min. Finally, a chromatogram of a sediment sample spiked at a 50 ng/g dw concentration level of all compounds is shown in Figure 70.

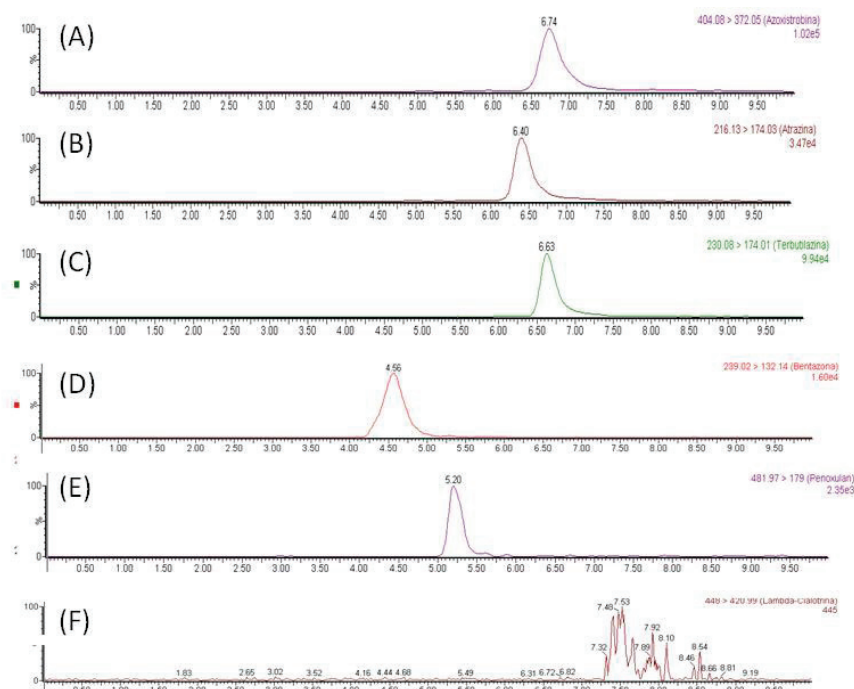


Figure 70. MRM chromatograms of a spiked sediment sample (50 ng/g dw of the target compounds) analysed with the proposed methodology: (A) azoxystrobin, (B) atrazine, (C) terbutylazine, (D) bentazone, (E) penoxsulam and (F) lambda-chyalthrin

2.4.2. Matrix effect

Due to the fact that ion suppression and enhancement originating from matrix components is common in electrospray ionization (ESI), this phenomenon was evaluated. The peak areas obtained when a standard solution in methanol (A_s) was injected in the UPLC-MS/MS (20 $\mu\text{g/L}$ of each compound) was compared to the peak area belong to the spiked sediment sample (A_{ss}) at the same level of concentration and the peak area for a non-spiked sediment sample (A_{nss}), according the following equation:

$$\text{ME (\%)} = (A_{ss} - A_{nss}) / A_s * 100$$

ME should be equal to 100% in absence of matrix effect. However, percentages lower or higher than 100% where observed when ion suppression and enhancement occurred, respectively. For the target compounds ME ranged from 10 to 17% which demonstrated a strong signal suppression because of sediment constituents. Consequently, a clean-up step should be added to the experimental procedure. After on-line SPE, ME ranged from 73 to 95%, which demonstrated the clean-up efficiency. For on-line SPE matrix effect calculation, a spiked aqueous extract (20 $\mu\text{g/L}$) was used as a standard solution (A_s). Taking into account the obtained results, quantitation of target compounds was carried out using an external matrix calibration.

2.4.3. Validation study

The developed analytical methodology was validated using spiked sediment samples because of the absence of certificate reference materials (CRMs) of all these pesticides in sediments. Linearity, sensitivity, accuracy and precision were evaluated and the obtained results are shown in Table 45.

Linear range was evaluated between 0.06 and 100 ng/g dw for all compounds except for lambda-cyhalothrin (12-300 ng/g dw) using a 10-point calibration curve. The linearity was verified according the criteria established by the ISO 8466-1 standard [ISO-1990]. Determination coefficients (r^2) were higher than 0.9957 for all compounds at the adequate range.

Accuracy and precision were evaluated at two different concentrations (20 and 70 ng/g dw), according to the European Decision 2002/657/CE [Decision-2002/657/EC]. The absolute recoveries (R%) were assessed by comparing chromatograms of matrix calibration with spiked samples and repeatability (RSD%) was calculated as within-day RSD of peak using 8 replicated analysed the same day and by the same analyst. Recoveries between 62 and 119% with RSD lower than 13% were observed in all cases which demonstrate the adequate accuracy and precision of the method.

Table 45. Quality assurance parameters of the analytical methodology (ng/g dw): linear range (determination coefficients, r^2), method detection limit (MDL) and method quantitation limit (MQL), absolute recoveries (R%) and repeatability (RSD, in per cent) in sediment samples. Relative expanded uncertainty estimated at 95% ($k=2$) corresponding to the two studied concentrations

Pesticide	Linear range (r^2)	MDL (ng/g)	MQL (ng/g)	Conc = 20 ng/g dw			Conc = 70 ng/g dw		
				R%	RSD%	Uexp%	R%	RSD%	Uexp%
Azoxystrobin	MQL-87 (0.9987)	0.63	1.9	62	12	11.3	68	11	9.5
Atrazine	MQL-87 (0.9995)	0.43	1.2	76	8	8.4	83	8	7.3
Terbuthylazine	MQL-87 (0.9986)	1.9	5.8	76	11	10.4	77	8	7.6
Bentazone	MQL-75 (0.9957)	2.7	8.1	112	12	17.0	119	12	15.5
Penoxsulam	MQL-87 (0.9973)	1.2	3.7	67	5	8.3	69	4	7.1
Lambda-cyhalothrin	MQL-240 (0.9986)	5.4	16.5	114	13	19.5	116	8	16.3

Uncertainty of the analytical method was also estimated on the basis of in-house validation data according to EURACHEM/CITAC guide for all compounds at two spiked levels [Ellison *et al.*, 2000]. The main sources of uncertainty were identified and quantified and combined uncertainty (u_c) was calculated as follows:

$$u_c(y) = \sqrt{u_1^2 + u_2^2 + u_3^2}$$

where u_1 is the uncertainty associated with the interpolation of the sample reading in calibration curve that reflects the influence of lack of fit of the regression plot in the analytical result; u_2 is the uncertainty associated with the preparation of the working standard and/or the uncertainties indicated by the supplier in the case that commercial standards were used and u_3 is the uncertainty associated with variability/precision of the method. The expanded uncertainty (u_{exp}) was estimated using the coverage factor $k=2$ for a level of confidence of 95%.

$$u_{exp} = k * u_c$$

As it was shown in Table 44, relative expanded uncertainties were lower than 20% for among all compounds.

The method detection limits (MDL) and the method quantitation limit (MQL) were calculated as $3*S_{y/x}/b$ and $10*S_{y/x}/b$, respectively, where $S_{y/x}$ is the standard error of the estimate curves and b is the slope of the calibration curves. MQL lower than 8.1 ng/g dw were observed for all compounds except for lambda-cyhalothrin (16.5 ng/g dw). Consequently, the proposed methodology allows the adequate determination of selected pesticides in sediments at trace levels.

2.4.4. Application to sediment samples

To demonstrate the applicability of the proposed methodology and to study the distribution of these compounds along the Mondego River, sediment samples were analyzed. Four sampling points along the river basin were selected taking into account possible source of pesticides, near the agricultural activities areas. Samples were collected in March and August of 2014 to evaluate the elimination of the target compounds.

Eight sediment samples (pool of samples collected at three different depths in each sampling point) were analyzed applying the proposed PLE-on-line SPE-UPLC-MS/MS method. The identification and confirmation of the target compounds were carried out according to the European Decision 2002/657/EC. Attending to this regulation [Decision-2002/657/EC], variations between retention times observed in the sample and in the injected standard should be lower than 2%; regarding the MRM ratio, the relative abundance of MRM transitions in the sample should not differ by more than 20% (ratio 1-2), 25% (ratio 2-5), 30% (ratio 5-10) or 50% (ratio 10-100) from the MRM observed in the injected standard.

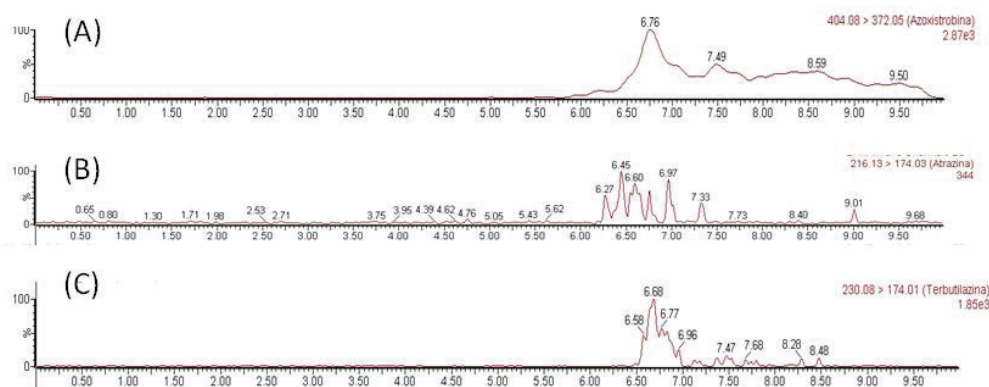
Obtained results are shown in Table 46. As it can be seen, differences between campaigns are observed. In March, bentazone and penoxsulam and lambda-cyhalothrin were not determined in any sampling point; however, azoxystrobin, atrazine and terbuthylazine were detected in one sampling point (E1) at concentrations of 3.79 ng/g dw, 1.79 ng/g dw and below MQL, respectively. The presence of atrazine at concentration below MQL was also found in E2. MRM chromatograms of the positive sample E1 was shown in Figure 71. On the other hand, no compounds were found in August, except bentazone which was detected in one sampling point (E1) at concentration below the MQL. In view of these results, the partial/total elimination of among all compounds was confirmed; however, more studies are needed to know the mechanism of elimination of these pesticides, as well as their possible distribution in the aquatic environment.

These concentrations are the same order to the reported in other Iberian rivers such as Ebro, Guadalquivir, Júcar and Llobregat [Köck-Schulmeyes *y cols.*, 2013] or Túrria River [Masiá *y cols.*, 2015].

Table 46. Concentrations (in ng/g dw) of pesticides in analysed sediment samples

Pesticide	Concentration (ng/g dw)							
	March, 2014				August, 2014			
	E1	E2	E3	E4	E1	E2	E3	E4
Azoxystrobin	3.79	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Atrazine	1.79	bMQL	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Terbuthylazine	bMQL	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Bentazone	nd	nd	nd	nd	bMQL	nd	nd	nd
Penoxsulam	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Lambda-cyhalothrin	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

nd = not detected; bMQL = below method quantitation limit

**Figure 71.** MRM chromatograms of the positive compounds in sample E1 (March, 2014): (A) azoxystrobin, (B) atrazine and (C) terbuthylazine

2.5. Extraction of algae samples

2.5.1. Optimization of SPLE parameters

The SPLE efficiency can be affected by different parameters such as extraction solvent, temperature, extraction time and clean-up sorbent. For optimization assays, pools of samples of different alga species *Ulva spp.* (Linnaeus, 1753), *Gracilaria gracilis* (Stackhouse, 1801) and *Fucus vesiculosus* (Linnaeus, 1753) collected in a pristine area (where no target pollutants are expected) were used. After collection, samples were frozen at -20°C, lyophilised, homogenised and stored at room temperature in the laboratory.

A small amount of alga sample (0.1 g) was mixed with 0.02 g of diatomaceous earth (dispersant agent) until homogenization, spiked with a small amount of standard solution at a concentration level of 100 ng/g dw for all compounds and

placed into the PLE cell for 2 hour in order to achieve more realistic interactions between analytes and matrix.

A univariate approach was applied for the optimization of SPLE parameters. In all cases, an exhaustive clean-up was employed because of the complexity of this matrix. Consequently, PLE extracts (1 mL) were diluted to 20 mL with ultrapure water and extracted and determined by the on-line SPE-LC-MS/MS methodology previously mentioned (sub-sections 2.2 and 2.3).

The first parameter considered was the solvent extraction ($n=3$): methanol, acetonitrile and a mixture acetone:methanol (50:50 v/v) were assayed. Other PLE variables were selected according previous experience as follows: temperature, 60°C; pressure, 1500 psi; static time, 3 min; number of cycles, 3; flush, 60% and purge, 60 s. As it can be seen in Figure 72, better results (higher recoveries and lower RSD%) for among all compounds were observed with methanol; consequently, and considering their availability, this solvent was chosen as the extraction solvent.

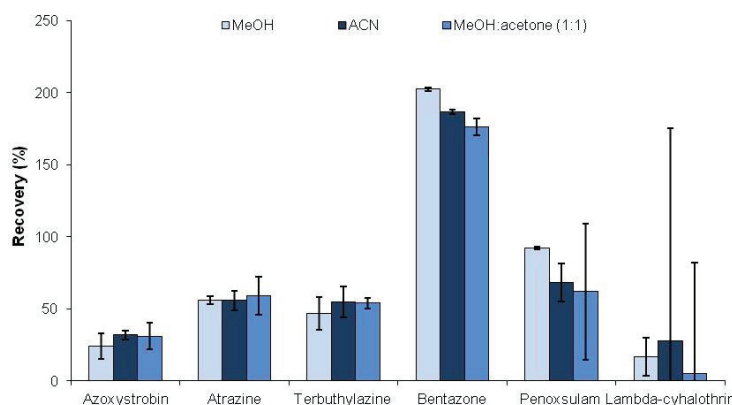


Figure 72. Selection of the solvent extraction ($n=3$)

Temperatures between 40°C and 100°C were also tested ($n=3$). In Figure 73 a decrease in recoveries (and a increase in RSD%) with higher temperatures can be seen in Figure 65, especially in the case of azoxystrobin, atrazine and terbutylazine. This fact can be explained by the higher matrix effect showed with higher temperature. For this reason, the lowest temperature (40°C) was selected.

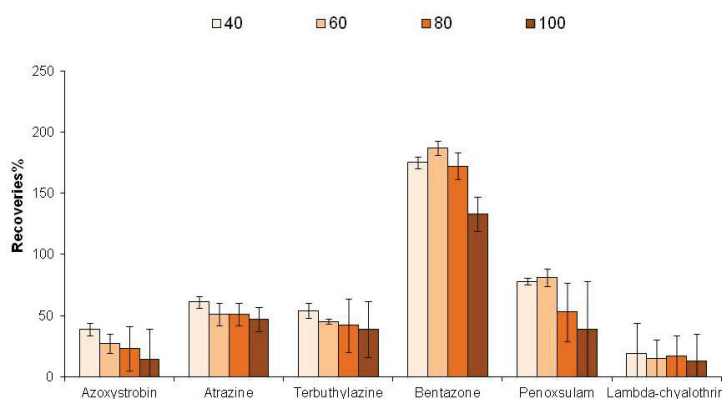


Figure 73. Study of the extraction temperature ($n=3$)

In these conditions, recoveries between 50-70% were observed for azoxystrobin, atrazine, terbuthylazine and penoxsulam; however, no adequate recoveries were obtained for bentazone (~180%) and lambda-cyhalothrin (~20%). To improve these results, a new set of experiments were performed. Different sorbents (0.7 g) were added to the bottom of the PLE cell (in-cell clean up) in order to carried out the simultaneous extraction and clean-up of the extracts (SPLE). Neutral and basic alumina, Florisil®, silica gel and primary-secondary amine (PSA) were tested (n=3) to select the best option for reducing interferences in the analysis (Fig 74). Florisil®, silica gel and PSA were discarded because of the lower recoveries obtained (R<30%) for lambda-cyhalothrin and penoxsulam. Neutral alumina was selected instead of basic alumina due to the better results observed for among all compounds.

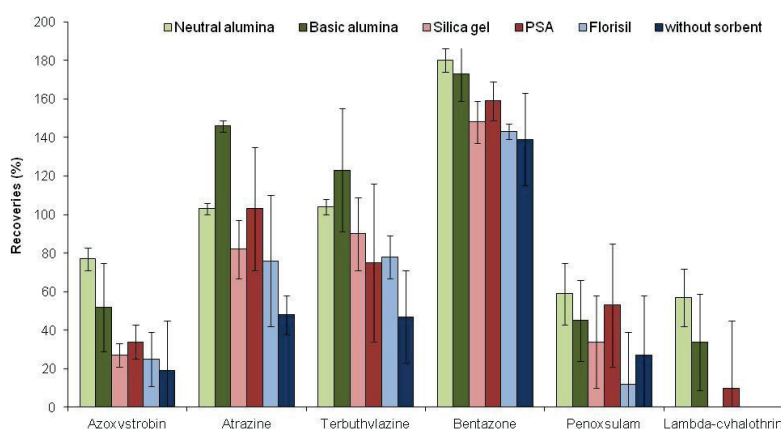


Figure 74. Selection of clean-up sorbents for SPLE (n=3)

Final conditions of the SPLE procedure are summed up in the following lines: solvent extraction, methanol; pressure, 1500 psi; temperature, 40°C; static time, 3 min; number of cycles, 3; dispersant agent, diatomaceous earth (0.02 g); clean-up sorbent, neutral alumina (0.7 g).

2.5.2. Matrix effect

Matrix effect (ME) was evaluated in alga analysis when the PLE-on-line SPE-UPLC-MS/MS methodology (first assay) was applied, according to the following equation:

$$ME(\%) = (A_{ss} - A_{nss}) / A_s * 100$$

where A_{ss} is the peak area of the spiked seaweed sample, A_{nss} is the peak area for a non-spiked seaweed sample and A_s is the peak area corresponding to a spiked aqueous extract (20 µg/L) used as a standard solution.

ME should be equal to 100% in absence of matrix effect. However, percentages lower or higher than 100% were observed when suppression and enhancement ion occurred, respectively. For some target compounds such as atrazine and terbuthylazine, moderate ME (~50-70%) were observed; however, high matrix effect

was obtained for the rest of pesticides, especially in the case of lambda-cyhalothrin (<20%) and bentazone (>150%). To correct this ME, a new clean-up step with neutral alumina (in-cell clean up) was added to the experimental procedure; after that, ME ranged from 50-100% for all compounds which demonstrated the in-cell clean-up efficiency. Quantitation of compounds was carried out using an external matrix calibration.

2.5.3. Validation study

The developed analytical methodology was validated using spiked alga samples because of the absence of certificate reference materials (CRMs) of selected pesticides in plants. Linearity, sensitivity, accuracy and precision were evaluated and the obtained results are shown in Table 47.

Linear range was evaluated between 1.4 and 800 ng/g dw for all compounds except for lambda-cyhalothrin (35-1300 ng/g dw) using a 10-point calibration curve. The linearity was verified according the criteria established by the ISO 8466-1 standard [ISO-1990]. Determination coefficients (r^2) were higher than 0.9912 for all compounds at the studied range.

Accuracy and precision were evaluated at two different concentrations (20 ng/g dw and 200 ng/g dw), according to the European Decision 2002/657/CE [Decision-2002/657/EC]. Absolute recoveries (R%) were assessed by comparing the chromatograms of matrix calibration with the spiked samples and repeatability (RSD%) was calculated as within-day RSD of peak using 6 replicated analysed the same day and by the same analyst. Recoveries between 49 and 101% with RSD lower than 14% were observed in all cases which demonstrate the adequate accuracy and the satisfactory precision of the method.

Table 47. Quality assurance parameters of the analytical methodology (ng/g dw): linear range (determination coefficients, r^2), method detection limit (MDL) and method quantitation limit (MQL), absolute recoveries (R%) and repeatability (RSD, in per cent) in sediment samples. Relative expanded uncertainty estimated at 95% ($k=2$) corresponding to the two studied concentrations

Pesticide	Linear range (r^2)	MDL (ng/g)	MQL (ng/g)	Conc = 20 ng/g dw			Conc = 200 ng/g dw		
				R%	RSD%	Uexp%	R%	RSD%	Uexp%
Azoxystrobin	MQL-600 (0.9959)	4.3	12.1	78	8	13.9	79	7	11.2
Atrazine	MQL-600 (0.9975)	3.4	10.9	80	7	12.2	88	2	8.4
Terbuthylazine	MQL-600 (0.9912)	2.2	6.8	65	7	13.2	90	10	9.0
Bentazone	MQL-600 (0.9970)	5.2	15.4	54	13	15.6	57	2	10.8
Penoxsulam	MQL-300 (0.9999)	8.9	17.2	50	9	14.6	49	4	9.9
Lambda-cyhalothrin	MQL-900 (0.9983)	5.3	15.8	101	8	20.1	97	4	13.3

Uncertainty of the analytical method was also estimated on the basis of in-house validation data according to EURACHEM/CITAC guide for all compounds at two spiked levels [Ellison *et al.*, 2000]. The main sources of uncertainty were identified and quantified and expanded uncertainty (u_{exp}) was estimated using the coverage factor (k) as 2 for a level of confidence of 95% as it was commented in the sub-section 2.4.3 (pp. 246). Relative expanded uncertainties were lower than 21% for among all compounds as it was shown in Table 46.

The method detection limit (MDL) and the method quantitation limit (MQL) were calculated as $3 \cdot S_{y/x}/b$ and $10 \cdot S_{y/x}/b$, respectively, where $S_{y/x}$ is the standard error of the estimate curves and b is the slope of the calibration curves. MQL lower than 17.2 ng/g dw (penoxsulam) were observed for all compounds including for lambda-cyhalothrin (15.8 ng/g dw). Consequently, the proposed methodology allows the determination of the six pesticides in algae at trace levels.

2.5.4. Application to alga samples

In order to demonstrate the applicability of the proposed methodology and to know the fate of the selected pesticides along the Mondego River alga samples were analyzed. Samples were collected in same four sampling points than sediments during March and August of 2014 to evaluate the elimination of target compounds. After collection, samples were frozen at -20°C, lyophilised, homogenised and stored at room temperature in the laboratory.

Seven alga samples *Ulva* spp. (Linnaeus, 1753) were analyzed applying the proposed SPLE-on-line SPE-UPLC-MS/MS methodology. As it was mentioned before, the identification and confirmation of the target compounds were carried out considering retention times and MRM transitions, according to the Decision 2002/657/EC [Decision-2002/657/EC].

The obtained results are shown in Table 48. As it can be seen, only terbuthylazine and lambda-cyhalothrin were detected in alga samples. Concentrations higher than 100 ng/g dw of terbuthylazine were observed in sampling points E2 and E3 during August campaign which demonstrated the bioaccumulation of this compound in algae. On the other hand, lambda-cyhalothrin was measured in among all sampling points in the two campaigns, but a concentration lower than the MQL (15.2 ng/g dw). In any case, the importance of the analysis of this compound in algae was demonstrated. However, further research to complement this study is needed in order to obtain reliable conclusions.

Table 48. Concentrations (in ng/g dw) of pesticides in the analysed *Ulva* spp. (Linnaeus, 1753) samples

Pesticide	Concentration (ng/g dw)							
	March, 2014				August, 2014			
	E1	E2	E3	E4	E1	E2	E3	E4
Azoxystrobin	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	NA
Atrazine	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	NA
Terbuthylazine	nd	nd	nd	nd	nd	108	149	NA
Bentazone	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	NA
Penoxsulam	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	NA
Lambda-cyhalothrin	bMQL	nd	bMQL	bMQL	bMQL	nd	bMQL	NA

nd = not detected; bMQL = below method quantitation limit; NA = not analyzed

These concentrations are similar to the reported in *Ulva* specie from a coastal lagoon of Italy [Carafa *y cols.*, 2007]. Differences in concentrations could be explained by species, habitats, maturity and environmental conditions [Yaich *y cols.*, 2015].

3. COMPARISON WITH PREVIOUS METHODOLOGIES

Proposed novel methodologies (PLE/SPLE-on-line SPE-UPLC-MS/MS) have important improvements in comparison with previous reported methods. Firstly, analytical procedures were optimized and validated for six pesticides, including one fungicide, four herbicides and one insecticide in different matrices. In sediments, some of these pollutants such as atrazine or terbuthylazine were quite studied in the last years; however few studies about its occurrence in algae can be found in the literature. On the other hand, the presence and behaviour of azoxystrobin, penoxsulam or bentazone in the environment are relatively unknown and therefore, methodologies that allow the simultaneous determination of these pesticides are required.

Ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) increases speed, with superior resolution and sensitivity than common LC-MS/MS. Moreover, derivatization step needed in the analysis of target pesticides by GC-MS can be avoided. In the case of lambda-chyaltrobin, and because of its chemical-properties, few works based on LC-MS determination can be found in the literature. However, our methodology allows the analysis of this fungicide with satisfactory accuracy and precision. Although higher quantitation limits (16.5 ng/g dw for sediments and 15.2 ng/g dw for algae) than the obtained with GC-MS (1-5 ng/g dw) were shown, this methodology can be used as an alternative method in routine analysis.

Regarding the extraction procedure, PLE has lots of advantages in comparison to Soxhlet [USEPA-1996] and ultrasound-assisted extraction (US) [Tadeo *y cols.*, 2010] such as selectivity, automaticity, low analysis time and low consume of toxic reagents (according to Green Chemistry principles). Furthermore, in the case of SPLE, simultaneous extraction and moderate clean-up was performed in only one step. On the other hand, an exhaustive clean-up step is usually needed during the analysis of pesticides in solid matrices by PLE (see Tables 41-42); on-line SPE allows the automatic clean-up of PLE extracts minimizing the use of toxic solvents, the analysis time and the waste generation, according with Green Chemistry principles.

Finally, low quantitation limits (< 16.5 ng/g dw for sediments and <17.8 ng/g dw for algae) were achieved with a small amount (1 g and 0.1 for sediments and algae, respectively) in comparison to 5-10 g [Köck-Schulmeyer *y cols.*, 2013; Mekebri *y cols.*, 2008] used in previous works for sediments and 1 g for algae. Consequently, these methods could be a useful tool in environmental research as well as in monitoring programs to control the presence of selected pesticides in the aquatic ecosystem.

4. CONCLUSIONS

Two novel, fast and automatic methodologies for the simultaneous analysis of six pesticides (one fungicide, four herbicides and one insecticide) in sediment and alga samples were developed and validated. For sediments, adequate precision and accuracy, as well as low method quantitation limits (<16.5 ng/g dw for lambda-cyhalothrin) were obtained with the PLE-on-line SPE-UPLC-MS/MS proposed methodology, using a small amount of sample (1 g of sediment). Satisfactory figures of merit were also achieved with the SPLE-on-line SPE-UPLC-MS/MS method for algae analysis. In this case, method quantitation limits lower than 17.2 ng/g dw (penoxsulam) were observed with 0.1 g of algae. Other advantages of these methodologies are automaticity (clean-up and determination in only one step), fastness (total analysis time of 20 min for sample) and consumption of low solvent volume and low waste generation, according with Green Chemistry principles. As far as we know, no previous works related to the analysis of pesticides in sediments and/or alga based on these methodologies could be found in literature. Furthermore, researches about the presence of some of these compounds such as penoxsulam or azoxystrobin are limited, which shows the importance and novelty of these proposed methods.

The application of the analytical methodologies to sediment and alga samples collected in the Mondego River demonstrated their practicability. Differences between campaigns could be found in two matrices: higher concentrations for sediments were measured in March whereas higher levels in algae were found in August. In sediments, azoxystrobin, atrazine and terbuthylazine were measured in only one sediment sampling point (March, 2014) at concentrations lower than 3.79 ng/g dw whereas the other three pesticides were not detected along the Mondego River. In algae *Ulva* spp. (Linnaeus, 1753), only terbuthylazine and lambda-cyhalothrin were determined in some sampling points during August. Taking into account these results, the study of these pollutants in sediment and alga samples of agricultural areas seemed to be interesting. Further research is needed to investigate the distribution, behaviour and impact of these pesticides in the aquatic environment.

References

- AERU-2011, Agriculture and Environment Research Unit (AERU). The PPDB, Pesticide Properties Database. University of Hertfordshire, UK.
<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/index2.htm>
- Andreu, V., Picó, Y. *Determination of pesticides and their degradation products in soil: critical review and comparison of methods*, TrAC Trends Anal Chem (2004) 23, 772-789.
- Arroyo-Mazanares, N., Lara, F.J., Airado-Rodríguez, D., Gámiz-Gracia, L., García-Camapanha, A.M. *Determination of sulfonamides in serum by on-line solid-phase extraction coupled to liquid chromatography with photoinduced fluorescence detection*, Talanta (2015) 138, 258-262.

- Barr, D.B., Needham, L.L. *Analytical methods for biological monitoring of exposure to pesticides: a review.*, J Chromatogr B (2002) 778, 5-29.
- Bones, J., Thomas, K., Nesterenko, P.N., Paull, B. *On-line preconcentration of pharmaceutical residues from large volume water samples using short reversed-phase monolithic cartridges coupled to LC-UV-ESI-MS*, Talanta (2006) 70, 1117-1128.
- Bottoni, P., Grenni, P., Lucentini, L., Caracciolo, B. *Terbutylazine and other triazines in Italian water resources*, Microchem J (2013) 107, 136-142.
- Camino-Sánchez, F.J., Zafra-Gómez, A., Pérez-Trujillo, J.P., Conde-González, J.E., Marques, J.C., Vilchez, J.L. *Validation of a GC-MS/MS method for simultaneous determination of 86 persistent organic pollutants in marine sediments by pressurized liquid extraction followed by stir bar sorptive extraction*, Chemosphere (2011) 84, 869-881.
- Cañero, A.I., Becerra, D., Cornejo, J., Hermosín, M.C., Albarrán, A., López-Pinheiro, A., Cox, L. *Transformation of organic wastes in soil: Effect on bentazone behaviour*, Sci Total Environ (2012) 433, 198-205.
- Carafa, R., Wollgast, J., Canuti, E., Ligthart, J., Dueri, S., Hanke, G., Eisenreich, S.J., Viaroli, P., Zaldivar, J.M. *Seasonal variations of selected herbicides and related metabolites in water, sediment, seaweed and clams in the Sacca di Goro coastal lagoon (Northern Adriatic)*, Chemosphere (2007) 69, 1625-1637.
- Corcellas, C., Eljarrat, E., Barceló, D. *First report of pyrethroid bioaccumulation in wild river fish: A case study in Iberian river basins (Spain)*, Environ Int (2015) 75, 110-116.
- Chen, L., Ding, L., Jin, H., Song, D., Zhang, H., Li, J., Zhang, K., Wang, Y., Zhang, H. *The determination of organochlorine pesticides based on dynamic microwave-assisted extraction coupled with on-line solid-phase extraction of high-performance liquid chromatography*, Anal Chim Acta (2007) 589, 239-246.
- Chiaia-Hernández, A.C., Krauss, M., Hollender, J. *Screening of lake sediments for emerging contaminants by liquid chromatography atmospheric pressure photoionization and electrospray ionization coupled to high resolution mass spectrometry*, Environ Sci Technol (2013) 47, 976-986.
- Dagnac, T., Bristeau, S., Jeannot, R., Mouvet, C., Baran, N. *Determination of chloroacetanilides, triazines and phenylureas and some of their metabolites in soils by pressurised liquid extraction, GC-MS/MS, LC-MS and LC-MS/MS*, J Chromatogr A (2005) 1067, 225-233.
- Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. DOCE, L 221/8.
- Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council of 12 August 2013 amending Directives 2000/60/EC as regards priority substances in the field of water policy. DOUE, L 226/1.
- Doppler, T., Lück, A., Camenzuli, L., Krauss, M., Stamm, C. *Critical source areas for herbicides can change location depending on rain events*, Agr Ecosyst Environ (2014) 192, 85-94.
- EFSA-2010, *Peer review report to the conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance azoxystrobin*
- Ellison, S.L.R., Rosslein, M., Williams, A., *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurements*. EURACHEM/CITAC, 2000.
- Ericsson, M., Colmsjö, A. *Dynamic microwave-assisted extraction coupled on-line with solid-phase extraction: determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments and soil.*, J Chromatogr A (2002) 964, 11-20.

- ERSAR-2014, Entidade Reguladora dos Serviços de Águas e Resíduos <http://www.ersar.pt>
- Ewence, A., Brecia, S., Johnson, I., Rumbsy, P.C. *An approach to the identification and regulation of endocrine disrupting pesticides*, Food Chem Toxicol (2015) 78, 214-220.
- Hurtado-Sánchez, M.C., Romero-González, R., Rodríguez-Cáceres, M.I., Durán-Merás, I., Garrido-Frenich, A. *Rapid and sensitive on-line solid phase extraction-ultra high performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry analysis of pesticides in surface waters*, J Chromatogr A (2010) 1305, 193-202.
- ISO 8466-1:1990. Water Quality. Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics. Part 1: Statistical evaluation of the linear calibration function.
- Kalogridi, E.C., Christophoridis, C., Bizani, E., Drimaropoulou, G., Fytianos, K. *Part II: temporal and spatial distribution of multiclass pesticide residues in lake sediments of northern Greece: application of an optimized MAE-LC-MS/MS pretreatment and analytical method*, Environ Sci Pollut Res Int (2014) 21, 7252-7262.
- Köck-Schulmeyes, M., Olmos, M., López de Alda, M., Barceló, D. *Development of a multiresidue method for analysis of pesticides in sediments based on isotope dilution and liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry*, J Chromatogr A (2013) 1305, 176-187.
- Kreuger, J. *Pesticides in stream water within an agricultural catchment in southern Sweden, 1990-1996*, Sci Tot Environ (1998) 27, 227-251.
- Leseur, C., Gartner, M., Mentler, A., Fuerhacker, M. *Comparison of four extraction methods for the analysis of 24 pesticides in soil samples with gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-ion trap-mass spectrometry*, Talanta (2008) 75, 284-293.
- Liu, L., Zhu, B., Wang, G.-X. *Azoxystrobin-induced excessive reactive oxygen species (ROS) production and inhibition of photosynthesis in the unicellular green algae Chlorella vulgaris*, Environmental Science and Pollution Research (2015) 22, 7766-7775.
- Loos, R., Iocor, G., Comero, S., Contini, S., Schwesig, D., Werres, F., Calsaa, P., Gans, O., Weiss, S., Blaha, L., Bolchi, M., Gawlik, B.M. *European survey on the occurrence of selected polar organic persistent pollutants in groundwater*, Water Res (2010) 4115-4126.
- Masiá, A., Vázquez, K., Campo, J., Picó, Y. *Assessment of two extraction methods to determine pesticides in soils, sediments and sludges. Application to the Túria River Basin.*, J Chromatogr A (2015) 1378, 19-31.
- Mekebri, A., Crane, D.B., Blondina, G.J., Oros, D.R., Rocca, J.L. *Extraction and analysis methods for the determination of pyrethroid insecticides in surface water, sediments and biological tissues at environmentally relevant concentrations*, Bull Environ Contam Toxicol (2008) 80, 455-460.
- Mercandante, R., Polledri, E., Bertazzi, A., Fustinoni, S. *Biomonitoring short- and long- term exposure to the herbicide terbuthylazine in agriculture workers in the general population using urine and hair specimens.*, Environ Int (2013) 60, 42-47.
- Navarro-Ortega, A., Tauler, R., Lacorte, S., Barceló, D. *Occurrence and transport of PAHs, pesticides and alkylphenols in sediment samples along the Ebro River Basin*, J Hydrol (2010) 383, 5-17.
- Pang, N., Wang, T., Hu, J. *Method validation and dissipation kinetics of four herbicides in maize and soil using QuEChERS sample preparation and liquid chromatography tandem mass spectrometry*, Food Chem (2015) doi:10.1016/j.foodchem.2015.05.081,

- Regueiro, J., Matamoros, V., Thibaut, R., Porte, C., Mayona, J.M. *Use of effect-direct analysis for the identification of organic toxicants in surface flow constructed wetland sediments*, Chemosphere (2013) 91, 1165-1175.
- Ricart, M., Guasch, H., Barceló, D., Brix, R., Conceição, M.H., Geislinger, A., López de Alda, M.J., López-Doval, J.C., Muñoz, I., Postigo, C., Romaní, A.M., Villagrasa, M., Sabater, S. *Primary and complex stressors in polluted Mediterranean rivers: Pesticide effects on biological communities*, J Hydrol (2010) 383, 52-61.
- Rodrigues, E.T., Lopes, I., M.A., P. *Occurrence, fate and effects of azoxystrobin in aquatic ecosystems: A Review*, Environ Int (2013) 52, 18-28.
- Rodríguez-Cruz, M.S., Jones, J.E., Bending, G.D. *Study of the spatial variation of the biodegradation rate of the herbicide bentazone with soil depth using contrasting incubation methods*, Chemosphere (2008) 73, 1211-1215.
- Rodríguez-González, N., González-Castro, M.J., Beceiro-González, E., Muniategui-Lorenzo, S. *Development of a matrix solid phase dispersion methodology for the determination of triazine herbicides in mussels*, Food Chem (2015) 173, 391-396.
- Rogeberg, M., Malerod, H., Roberg-Larsen, H.R., Aass, C., Wilson, S.R. *On-line solid phase extraction-liquid chromatography, with emphasis on modern bioanalysis and miniaturized systems.*, J Pharm Biomed Anal (2014) 87, 120-129.
- Saillenfait, A.M., Ndiaye, D., Sabaté, J.P. *Pyrethroids: Exposure and health effects - an update*, Int J Hyg Environ Health (2015) 218, 281-292.
- Swartz, M. *Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC): An Introduction*, Sep Sci Redefined (2005) 8, 1-5.
- Syngenta-2010, Syngenta Global Website. Bringing plant potential to life www.syngenta.com
- Tadeo, J.L., Sánchez-Brunete, C., Albero, B., García-Valcárcel, A.I. *Application of ultrasound-assisted extraction to the determination of contaminants in food and soil samples*, J Chromatogr A (2010) 1217, 2415-2440.
- Tsochatzis, E.D., Tzimou-Tsitouridou, R., Menkissoglu-Spiroudi, U., Karpouzas, D.G., Katsantonis, D. *Laboratory and field dissipation of penoxsulam, tricyclazole and profoxydim in rice paddy systems*, Chemosphere (2013) 91, 1049-1057.
- USEPA-1996, US EPA method 3540C, US Government Printing Office, Washington, USA, 1996 <http://www.epa.gov/sw-846/pdfs/3540c.pdf>
- Van Emon, J.M., Chuang, J.C. *Development of a simultaneous extraction and cleanup method for pyrethroid pesticides from indoor house dust samples*, Anal Chim Acta (2012) 745, 38-44.
- Villaverde, J., Hildebrandt, A., Martínez, E., Lacorte, S., Morillo, E., Maqueda, C., Viana, P., Barceló, D. *Priority pesticides and their degradation products in river sediments from Portugal*, Sci Tot Environ (2008) 390, 507-513.
- Wang, Y., You, J.Y., Ren, R.B., Xiao, Y., Gao, S.Q., Zhang, H.Q. *Determination of triazines in honey by dispersive liquid-liquid microextraction high-performance-liquid chromatography*, J Chromatogr A (2010) 4241-4246.
- Wick, A., Fink, G., Ternes, T.A. *Comparison of electrospray ionization and atmospheric pressure chemical ionization for multi-residue analysis of biocides, UV-filters and benzothiazoles in aqueous matrices and activated sludge by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*, J Chromatogr A (2010) 1217, 2088-2103.
- Yaich, H., Garna, H., Bchir, B., Besbes, S., Paquot, M., Richel, A., Blecker, C., Attia, H. *Chemical composition and functional properties of dietary fibre extracted by Englyst and Prosky methods*

from the alga Ulva lactuca collected in Tunisia, Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts (2015) 9, 65-73.

You, J., Wang, D., Lydy, M.J. *Determination of pyrethroid insecticides in sediment by gas chromatography-ion trap tandem mass spectrometry*, *Talanta* (2010) 81, 136-141.

Sección V

Conclusiones generales

Endocrine disrupting compounds (EDCs) cause adverse effects in the hormonal system of human and animals at low concentrations. Among all EDCs, and taking into account their widely use in industrial and household applications and their toxicity, this Thesis was focused on five of them: four alkylphenols and bisphenol A. Moreover, other compounds such as phthalates, sex hormones and pesticides were investigated. In order to preserve the environment and to protect human health, some of these compounds have been regulated; however, other EDCs are still unknown. Consequently, further ecotoxicological and environmental studies that demonstrate their behaviour, effects and occurrence are required. To carry out these investigations analytical methodologies which allow the determination of EDCs at low concentrations are needed.

One of the aims of this Thesis was the optimization and validation of sensitive and selective analytical methodologies for the simultaneous determination of alkylphenols and bisphenol A in environmental samples. Almost all of the selected techniques were applied to the analysis of these compounds for the first time, which demonstrates the novelty and importance of the proposed methods. Because of their advantages (fast, automatic and green methods) and satisfactory figures of merit obtained (good accuracy and precision), these methodologies improve the previous ones found in the literature for the same purpose. Furthermore, low method quantitation limits were achieved making easier the sampling, transport and storage of the samples; in this way, developed methods could be incorporated in monitoring programs to control water quality.

The instrumental technique selected for APs and BPA detection was liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS); multiple reaction monitoring (MRM) was chosen as an acquisition mode because of its sensitivity and selectivity. Variables related to the mass spectrometer, the ionization source and the chromatographic separation were optimized and good analytical parameters were observed. Furthermore, blank contamination problems were exhaustively studied and mobile phase solvents seemed to be the main source of contamination. Chromatographic peaks obtained in instrumental blanks for 4-tOP were totally removed and for NP were minimized (factor of 10000). Consequently, low instrumental detection and quantitation limits (<3 ng) were achieved.

Plastic materials should be avoided during all the experimental procedure. Due to the fact that alkylphenols can be present in detergents, a cleaning procedure for glassware material based on Milli-Q water, acetone and methanol was proposed for routine analysis. Some aspects about sample pretreatment such as storage and filtration of water samples were evaluated. The maximum storage time of samples at 4°C was 5 days when no modifiers are added, in order to avoid losses of analytes. Filtration of the water samples was not recommended because of the retention of compounds in nylon, cellulose and glass fibre filters; in cases that prefiltration is mandatory (considering the extraction technique or the presence of particulates), the

use of glass fibre filters was suggested. Regarding sample treatment stages, filtration of final extracts before LC-MS injection was advised using a PTFE syringe filters. Although many of these characteristics are related to water sample analysis, others can be also applied to different matrices which demonstrate the importance of this type of considerations.

For water samples analysis, two analytical methodologies were optimized and validated. One of them is based on a dispersive liquid liquid microextraction (DLLME-LC-MS/MS) and allows the determination of APs and BPA in seawater samples. The second one is focused on the analysis of APs in surface water, tap water and seawater samples by means of miniaturized membrane assisted solvent extraction (MASE-LC-MS/MS). Both methods are fast, simple, sensitive and green (according with Green Chemistry principles) which improves the previous methodologies found in the literature. Furthermore, the Environmental Quality Standards (EQS) established by Directive 2013/39/EU have been achieved with both methodologies using less than 30 mL of water samples.

On the other hand, two methodologies were developed and validated for the analysis of the target compounds in marine sediment samples. The first one is based on a selective pressurized liquid extraction (SPLE-LC-MS/MS) for APs and BPA analysis; the second one is focused on a pressurized hot water extraction followed by miniaturized membrane assisted solvent extraction (PHWE-MASE-LC-MS/MS) for the determination of APs under excellent green conditions. Both methodologies allow the achievement of low MQL with only 0.5 g of sediment sample. Automaticity, fastness and simplicity are some of the advantages of the proposed methods, which improve the methodologies previously published.

A selective pressurized liquid extraction method (SPLE-LC-MS/MS) was optimized and validated for the simultaneous analysis of APs and BPA in mussel samples; in addition, its application to the determination of these compounds in other species (such as clams) was proved. Using only 0.5 g of sample, low method quantitation limits were achieved. These advantages really improved previous methodologies found in the literature.

Two environmental studies were carried out applying these novel and green analytical methodologies. These researches are the first ones performed in Galicia (North-West of Spain) and consequently, new data about the occurrence of alkylphenols and bisphenol A in these zones have been obtained. Furthermore, this study contributes to know the behaviour of linear isomers, scarcely considered in environmental researches. This fact demonstrates the originality and relevance of the observed results.

In the first study, the presence and spatial distribution of APs and BPA in coastal waters from Galicia (ría de Arousa, Vigo, Pontevedra and A Coruña) and Bay of Biscay (Bahía de Santander) were analyzed. Linear isomers were determined in 7% of samples at concentrations lower than 0.016 µg/L and 0.009 µg/L for 4-*n*-NP and

4-*n*-OP, respectively. The presence of branched alkylphenols was demonstrated in more than 18% (4-tOP) and 60% (NP) of total samples, at concentrations between <MQL and 0.072 µg/L for 4-tOP and between <MQL and 0.337 µg/L for NP. The spatial distribution of alkylphenols showed that wastewater treatment plants effluents, harbours and nautical clubs were the main sources of contamination. BPA was measured in 6% of total samples at levels lower than 0.146 µg/L, and associated at industrial discharges.

The fate of these EDCs in a Miño river basin was also studied. In this case and as a preliminary research, the distribution and bioaccumulation of these pollutants in waters, sediment and biota (*Corbicula fluminea* Müller, 1774) samples were evaluated. Whereas branched alkylphenols were determined in all compartments (water, sediment and biota), linear isomers were scarcely detected in waters and sediments; the occurrence of 4-*n*-nonylphenol in biota samples justified its high bioaccumulation and its importance as a priority pollutant in aquatic ecosystems. Municipal effluents, nautical activities and agriculture seemed to be the main sources of contamination of alkylphenols. Bisphenol A was measured in some water sampling points at high levels (>3.7 µg/L), which were explained by industrial discharges; however, its sorption to sediments and bioaccumulation in biota is limited. Furthermore, partitioning and bioaccumulation of 4-tOP and NP in water-sediment-*Corbicula fluminea* was evaluated and high sorption to sediments and bioaccumulation in this specie was observed for NP.

Besides, and as a first approach to risk assessment, ecological and human impacts (via ingestion) of these compounds were estimated in terms of risk quotient and daily intake estimations, respectively. In both researches mentioned before, results concluded that there is no risk to the environment and humans at those levels; however, further research based on this issue and on other routes of exposure (inhalation, dermal pathway) is needed to support this evaluation. In any case, the observed results demonstrate the significance of the analysis of these compounds in these areas because their presence is associated with different activities which are relevant in Galicia.

Two research short stays were carried out to contribute to the main objectives of this Doctoral Thesis as well as to start a new research topic to consider in the future. In both cases, and as far as we know, no previous works related with the aim of investigations and with proposed methodologies could be found in the literature, which demonstrate the originality and the relevance of the studies carried out in these stays.

The first one took place in the Environmental Chemistry Department of the Institute of Environmental Assessment and Water Research of the Spanish Council for Scientific Research (IDAEA-CSIC) in Barcelona (2011). An analytical method based on a pressurized liquid extraction followed by liquid chromatography tandem mass spectrometry for the simultaneous determination of 13 EDCs (alkylphenols, bisphenol

A, phthalates, sex hormones) in airborne particles (PM_{2.5}) were performed. The proposed methodology is fast, simple, selective, green and allows the achievement of low method quantitation limits with a small amount of sample (1/8 filter). After the optimization and the validation study, in which satisfactory figures of merit were obtained, the method was applied to real samples collected in the metropolitan area of A Coruña and compounds such as NP, DBP and DEHP were determined in all analyzed samples.

The second short stay was done in the Water Institute Northern Region (IAREN) in Porto, Portugal (2015). In this case, novel, fast and automatic methodologies for the simultaneous analysis of selected pesticides (fungicide, herbicides and insecticide) in sediment and alga samples based on a (selective) pressurized liquid extraction followed by a on-line SPE and ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry determination (PLE-on-line SPE-UPLC-MS/MS) were developed and validated. Satisfactory precision and accuracy, as well as low quantitation limits were obtained with the proposed methodologies, using a small amount of sample (1 g of sediment and 0.01 g of algae). The method was applied to the analysis of sediments and algae *Ulva spp.* (Linnaeus, 1753) collected in Mondego river (Portugal). Azoxystrobin, atrazine and terbuthylazine were measured in only one sediment sampling point at low concentrations (<2.38 ng/g dw) whereas the other three pesticides were not detected in sediments along the Mondego River. For algae, only terbuthylazine and lambda-cyhalothrin were detected at concentrations of 100 ng/g dw and below 15.2 ng/g dw, respectively.

This Thesis provides helpful information for: (a) understanding the behaviour of these compounds in marine environment, (b) the consideration of 4-*n*-nonylphenol in environmental studies as a priority substance because of their high bioaccumulation in organisms, (c) the establishment of EQS for alkylphenols in sediment and/or biota according to the Directive 2013/39/EU, (d) carrying out a new evaluation of BPA as a hazardous substance due to its presence in the environment, especially in waters, and its effects in human health, (e) assessing the inhalation of EDCs as a exposure route for humans and (f) showing the need of further research focused on emerging pesticides which can pose risk to the environment and human health.

Anexos

Publicaciones científicas

ÍNDICE ANEXOS

<i>Anexo I.</i> Determination of alkylphenols and bisphenol A in seawater samples by dispersive liquid-liquid microextraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry for compliance with environmental quality standards (Directive 2008/105/EC). <i>J Chromatogr A</i> , 1223 (2012) 1-8	281
<i>Anexo II.</i> Blank and sample handling troubleshooting in ultratrace analysis of alkylphenols and bisphenol A by liquid chromatography tandem mass spectrometry. <i>Talanta</i> , 101 (2012) 413-418	291
<i>Anexo III.</i> Membrane assisted solvent extraction coupled with liquid chromatography tandem mass spectrometry applied to the analysis of alkylphenols in water samples. <i>J Chromatogr A</i> , 1281 (2013) 46-53	301
<i>Anexo IV.</i> Analysis of endocrine disruptor compounds in marine sediments by in cell clean up-presurized liquid extraction-liquid chromatography mass spectrometry determination, <i>Anal Chim Acta</i> , 852 (2014) 112-120	311
<i>Anexo V.</i> Pressurized hot water extraction followed by miniaturized membrane assisted solvent extraction for the green analysis of alkylphenols in sediments. <i>J Chromatogr A</i> , 1383 (2015) 8-17	323
<i>Anexo VI.</i> Fast and selective pressurized liquid extraction with simultaneous in cell clean up for the analysis of alkylphenols and bisphenol A in bivalve molluscs. <i>J Chromatogr A</i> , 1270 (2012) 80-87	335
<i>Anexo VII.</i> Occurrence of endocrine disrupting compounds in five estuaries of the northwest coast of Spain: Ecological and human health impact. <i>Chemosphere</i> , 131 (2015) 241-247	345
<i>Anexo VIII.</i> Occurrence, distribution and bioaccumulation of endocrine disrupting compounds in water, sediment and biota samples from a European river basin. <i>Sci Total Environ</i> , 529 (2015) 121-130	363
<i>Anexo IX.</i> Determination of 13 estrogenic endocrine disrupting compounds in atmospheric particulate matter by pressurised liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. <i>Anal Bioanal Chem</i> , 405 (2013) 8913-8923	387
<i>Anexo X.</i> Analysis and occurrence of endocrine-disrupting chemicals in airborne particles. <i>TrAC, Trends Anal Chem</i> 66 (2015) 45-52	401
<i>Anexo XI.</i> Otras publicaciones	411

ANEXO I

Determination of alkylphenols and bisphenol A in seawater samples by dispersive liquid-liquid microextraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry for compliance with Environmental Quality Standards (Directive 2008/105/EC)

J Chromatogr A, 1223 (2012) 1-8



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Chromatography A

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chroma

Determination of alkylphenols and bisphenol A in seawater samples by dispersive liquid–liquid microextraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry for compliance with environmental quality standards (Directive 2008/105/EC)

N. Salgueiro-González^a, E. Concha-Graña^a, I. Turnes-Carou^a, S. Muniategui-Lorenzo^{a,*},
P. López-Mahía^{a,b}, D. Prada-Rodríguez^{a,b}

^a Department of Analytical Chemistry, University of A Coruña, Campus da Zapateira, Rúa da Fraga 10, E-15008 A Coruña, Spain

^b University Institute of Environment, Pazo de Lóngora, Liáns, Oleiros E-15179, A Coruña, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 September 2011

Received in revised form

30 November 2011

Accepted 1 December 2011

Available online 9 December 2011

Keywords:

Alkylphenols

Bisphenol A

Seawater

Dispersive liquid–liquid microextraction

LC–ESI–MS/MS

ABSTRACT

A fast, simple, sensitive and green analytical chemistry method for the simultaneous determination of alkylphenols (4-tert-octylphenol, 4-octylphenol, 4-n-nonylphenol, nonylphenol) and bisphenol A in seawater was developed and validated. The procedure was based on a dispersive liquid–liquid microextraction (DLLME) of a small volume of seawater sample (30 mL) using only 100 μ L of 1-octanol, combined with liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry in negative mode (LC–ESI–MS/MS). The matrix effect was studied and compensated using deuterated labelled standards as surrogate standards for the quantitation of target compounds. The analytical features of the proposed method were satisfactory: repeatability and intermediate precision were <10% and recoveries were around 84–104% for all compounds. Uncertainty assessment of measurement was estimated on the basis of an in-house validation according to EURACHEM/CITAC guide. Quantitation limits of the method (MQL) ranged between 0.005 and 0.03 μ g L^{−1}, therefore the levels established in the Directive 2008/105/EC were achieved. The applicability of the proposed method was demonstrated analyzing seawater samples from different sites of A Coruña (Northwest of Spain). The analyses showed the presence of all compounds at levels between 0.035 (bisphenol A) and 0.14 μ g L^{−1} (nonylphenol).

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Alkylphenols (APs) have been used in the production of herbicides, detergents and synthetic resin products. In addition, they are the biodegradation products of alkylphenols polyethoxylates, one of the main non-ionic surfactants in industrial applications [1]. Bisphenol A (BPA) is used as a monomer for the production of epoxy resins, phenol resins, polycarbonates, polyesters and lacquer coatings for food cans [2].

These compounds are considered synthetic endocrine-disrupting chemicals because they can alter immune functions, produce sexual dysfunction or cause cancer at low concentrations [3]. For all these reasons, alkylphenols (specifically 4-tert-octylphenol and 4-nonylphenol) have been included in the Water Framework Directive 2000/60/EC [4] and in the Directive 2008/105/EC [5] which sets the Environmental Quality Standards (EQS) for these compounds. The annual average (AA) for

4-nonylphenol in seawater samples (other surface waters) is 0.3 μ g L^{−1}, whereas the maximum allowable concentration (MAC) is 2 μ g L^{−1}. In the case of 4-tert-octylphenol, the MAC is not applicable since the AA (0.01 μ g L^{−1}) is significantly lower than the values derived on the basis on acute toxicity. Therefore, it is considered protective against short-term pollution peaks in continuous discharges.

On the other hand, bisphenol A has not being legislated in water yet. However, it is included in the Annex II of the Directive 2008/105/EC as a future regulated substance in the “list of 33 priority substances” [5]. Furthermore, the Directive 2009/90/EC establishes that the quantitation limit of the method must be lower than 30% of the EQS (Directive 2008/105/EC) [6].

In order to support the implementation of the Directive 2008/105/EC, fast, simple and sensitive analytical methods are needed. Furthermore, the incorporation of these analytical methodologies in monitoring programs is mandatory in order to control the presence of pollutants in the environment.

Different chromatography techniques were used to determine alkylphenols and bisphenol A. Gas chromatography has been widely used [7–9]; however, due to the polarity and the low

* Corresponding author. Tel.: +34 981 167000; fax: +34 981 167065.
E-mail address: smuniat@udc.es (S. Muniategui-Lorenzo).

volatility of these compounds a derivatization step is frequently needed. In order to avoid losses of analytes and to simplify the experimental process, liquid chromatography is the most used technique.

Although liquid chromatography coupled with ultraviolet visible and fluorescence detectors are used for the determination of APs and BPA [10–12], these detectors do not have the inherent specificity of the mass spectrometer. Furthermore, a tedious sample preparation is required and interferences are common in the analysis of complex matrices [13].

Therefore, liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC–MS) is the most powerful tool to analyze APs and BPA in environmental matrices [1,13–16]. Besides its sensitivity and selectivity, the emergence of new ionization techniques which allow the soft ionization of a wide range of substances, such as electrospray (ESI) and atmospheric pressure chemical ionization (APCI), have encouraged the use of this technique in the last years.

An efficient sample preparation to remove possible interferences and preconcentrate the analytes is also mandatory to achieve the required levels. APs and BPA are commonly extracted by solid phase extraction (SPE) [1,13–15]. However, this technique is being replaced by other fast and simple techniques that minimize the waste of organic solvents according with the principles of the Green Chemistry.

Dispersive liquid–liquid microextraction (DLLME) [10,17], was introduced by Rezaee et al. [18] in 2006 and is based on the extraction of analytes in aqueous samples by an appropriated mixture of extraction solvent and dispersant agent producing a cloudy solution. Some of its advantages are short extraction time, ease of operation, low cost and high enrichment factors. The main problem is the correct selection of mixture of solvents because losses of analytes can take place. To avoid this situation, some authors suggest that dispersant agent can be eliminated using an adequate extraction solvent helped with an agitation step to achieve the formation of the cloudy [19].

The main novelty of this paper is the development and validation of a simple, fast, sensitive and environmental friendly method for the simultaneous determination of APs and BPA in seawater based on dispersive liquid–liquid microextraction followed by the determination using LC–ESI–MS/MS. Although these compounds have been investigated in different environmental matrices, they are scarcely studied in seawater because of the difficulty of the matrix and the low levels of concentration [20]. Therefore, analytical methodologies are needed in order to investigate the distribution and partitioning of these compounds in marine ecosystem. This method enables the determination of these pollutants at ultratrace levels according to the restrictive legislation (Directive 2008/105/EC) analyzing only 30 mL of sample; consequently it can be an important tool for monitoring strategies to control the presence of alkylphenols and bisphenol A in seawater samples. As far as we know, other published works do not achieve these low limits or need to process higher volumes of samples which are difficult to manipulate and storage.

2. Experimental

2.1. Standards and reagents

Nonylphenol technical mixture (NP) 94% purity ($\pm 1\%$ tolerance) and 4-n-nonylphenol (4-n-NP) 99.9% purity ($\pm 0.5\%$ tolerance) were from Riedel-de Haën (Seelze, Germany). Bisphenol A (BPA) 99% purity ($\pm 0.5\%$ tolerance), 4-tert-octylphenol (4-tOP) 97% purity ($\pm 0.5\%$ tolerance) and 4-octylphenol (4-OP) 99% purity ($\pm 0.5\%$ tolerance) were obtained from Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany). All standard solutions (1000, 10 and 1 mg L^{−1}) containing all the

compounds were prepared in methanol (SPS grade) from Romil Ltd. (Cambridge, United Kingdom) and stored at 4 °C.

As surrogate internal standards, 4-n-nonylphenol-2,3,5,6-d₄ (NP-d₄) 99.3% was obtained from CDN Isotopes (Pointe-Claire, Canada) and solution of bisphenol A-d₁₆ (BPA-d₁₆) 99.5% in acetonitrile (100 mg L^{−1}) was from Dr. Ehrenstorfer GMBH (Augsburg, Germany).

For the extraction, 1-octanol Chromasolv® (grade HPLC 99%) was from Sigma–Aldrich Co. (Madrid, Spain). For the determination, methanol LC–MS PAI and ammonia (30%) for instrumental analysis were from Panreac (Barcelona, Spain). Water was purified with a Direct 5 Milli Q system (Millipore, Bedford, MA, USA). Seawater samples were used for the optimization and validation of the analysis method.

2.2. Sampling

Seawater samples were collected in amber glass containers and stored refrigerated at 4 °C before the analysis. Due to the low stability of APs and BPA, samples had to be analyzed within five days of their sampling.

2.3. Extraction

Aliquots of 30 mL of seawater samples were extracted as follows: 100 µL of 1-octanol was added as extractant solvent and the mixture was vigorously shaken using an agitation plate Vibrax–VXR by IKA (Staufen, Germany) during 5 min at 1200 rpm. Separation of two phases occurred upon centrifugation (Eppendorf 5804, Madrid, Spain) at 3500 rpm for 3 min. The fine droplets of 1-octanol were collected and the volume was adjusted to 1 mL with methanol due to the immiscibility of the 1-octanol with the LC mobile phase. To remove any solid particles that might interfere in the analysis and damage the equipment, the extract was passed through a 0.2 µm syringe filter of PTFE (Teknokroma, Barcelona, Spain) before LC injection.

2.4. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry

LC analyses were performed using an Agilent HP-1200 Series LC system equipped with an autosampler (volume injected was 25 µL), a binary solvent pump and a thermostated column oven. The chromatographic separation was carried out with a column Hypersil Gold C18 (150 mm × 2.1 mm), 3 µm Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA), using as mobile phase A (water) and B (methanol) with 0.05% of ammonia as modifier. A 14 min gradient was performed as follows: 20% B (1 min) to 100% B in 4 min; this percentage was maintained for 7 min and returned to initial conditions in 2 min. The system was re-equilibrated for 7 min between runs. The flow rate was 0.25 mL min^{−1} and the oven temperature was set at 40 °C.

The LC system is coupled to a mass spectrometer with a triple quadrupole detector (API 3200, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). It was equipped with an APCI/ESI source. All compounds were detected with ESI interface operating in negative mode.

2.5. Quantitation and quality control

Multiple-reaction monitoring (MRM) was chosen as acquisition mode because it allows high sensitivity and selectivity [1] and deuterated surrogate standards were used for the quantitation in order to correct matrix effect [14]. BPA-d₁₆ was used as BPA surrogate, whereas 4-NP-d₄ was used to determine APs.

According to the Decision 2002/657/EC, four identification points (one precursor ion and two products ions) were required

for a suitable confirmation of the compounds for LC–MS/MS analysis. Furthermore, the relation between the transitions (MRM ratio) was also used as a criterion for the identification in samples analysis [21].

2.6. Blank contamination considerations

Blank contamination is a common problem in the determination of alkylphenols and bisphenol A at these low levels. In order to reduce blank problems, the use of detergents and plastic material should be avoided. All the glassware was carefully washed with acetone, Milli-Q water and methanol before use.

Blank analysis revealed the presence of NP at level of concentration $<5 \text{ ng L}^{-1}$. Consequently, procedural blanks were frequently checked and kept under control. In order to identify the source of NP, procedural blank (non-spiked seawater sample) and solvent blank (no sample) were compared. The responses obtained in both cases were similar; therefore, it can be concluded that blank contamination come mainly from the experimental process. Procedural blanks were analyzed in triplicate and the contribution of NP ($<5 \text{ ng L}^{-1}$) was subtracted from the samples in order to avoid overestimations in the results.

3. Results and discussion

3.1. Study of LC–MS/MS variables

Optimization of MS/MS settings was performed by direct infusion of individual standard solutions using MS software (Analyst 1.4, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). The relevant instrument settings for each compound are shown in Table 1. According to the Decision 2002/657/EC [21], two products ions were chosen for the suitable confirmation of each compound, except for 4-OP because of the presence of an interference in one of them [15]. The parent ion of BPA- d_{16} was 241 instead of 242 because it becomes BPA- d_{15} in water [22]. The ion spray voltage was the maximum level –4500 V. The rest of parameters of the source that have influence in the ionization were tested using a multivariable Plackett–Burman $2^7 \times 3/32$ randomized design with one dummy factor. The experimental matrix was obtained using the statistical program Statgraphics 5.0 for Windows (Table 2). The response in each experiment was measured as area of peak and the results were analyzed by means of the representation of the first and second order Pareto charts ($P = 95.0\%$).

The Pareto charts (Fig. 1) obtained for each compound show that collision gas flow is the only significant factor for alkylphenols. No interactions between variables were observed. The selected value

Table 2

Variables and values of the Plackett–Burmann design used in the optimization of the MS/MS conditions.

Variables (units)	Minimum value	Maximum value
Modifier: ammonium acetate (mM)	0	10
Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	200	650
Gas nebulizer flow (psi)	20	60
Curtain gas flow (psi)	10	30
Collision gas flow (psi)	0	10
Vertical distance between the capillary and source (mm)	5	10
Dummy	–1	1

of collision gas was the maximum (12 psi) because of its positive influence. The values of the no significant parameters were selected according to the sign of the estimated effect as well other instrumental conditions: nitrogen was used as curtain gas (10 psi) and nebulizer gas (35 psi). The auxiliary gas (35 psi) was air. The temperature of the source was fixed at 650°C and the vertical distance between the capillary and the source was 5 mm.

Due to the influence of the mobile-phase composition on the ionization efficiency in LC–ESI–MS/MS three kinds of modifiers were studied: acetic acid (0.05%, v/v) [23], ammonium acetate (2.5 mM) [13,14,24] and ammonia (0.05%, v/v) [25]. Fig. 2 shows that ammonia highly increases the response of APs. Basic pH (>8)

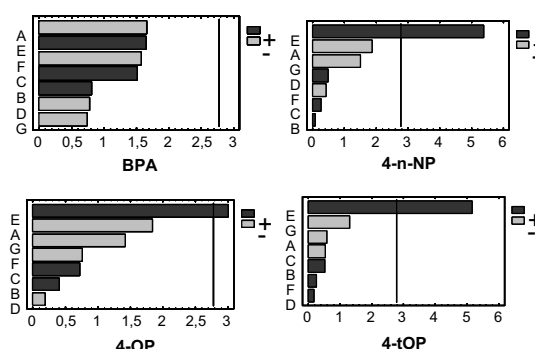


Fig. 1. Optimization of MS/MS conditions: First order Pareto Charts obtained for all compounds. Variables of the study were modifier of the mobile phase (A), temperature (B), gas nebulizer flow (C), curtain gas flow (D), collision gas flow (E), vertical distance (F) and dummy (G).

Table 1

Parent and fragment ions, retention times and MS/MS parameters for each compound.

Analyte	t_R (min)	Precursor ion (m/z)	Product ions (m/z)	Declustering potential (V)	Collision energy (V)	MRM ratio ^b
BPA- d_{16}	9.39	241 [M–D] [–]	142 ^a 221	–45	–44 –46	1.6 ± 0.1
BPA	9.40	227 [M–H] [–]	212 ^a 133	–40	–24 –32	15.7 ± 2.8
4-tOP	10.62	205 [M–H] [–]	133 ^a 116	–45	–30 –76	8.9 ± 0.3
NP	10.89	229 [M–H] [–]	133 ^a 116	–40	–38 –74	5.8 ± 0.1
4-OP	10.99	205 [M–H] [–]	106 ^a –	–50	–26 –	–
4-n-NP	11.23	219 [M–H] [–]	106 ^a 119	–45	–28 –44	22.4 ± 0.4
NP- d_4	11.23	223 [M–D] [–]	109 ^a 129	–45	–28 –46	14.4 ± 1.1

^a Quantitation ion.

^b Ratio and tolerances between quantification and confirmation MRM transitions according to Decision 2002/657/EC [21].

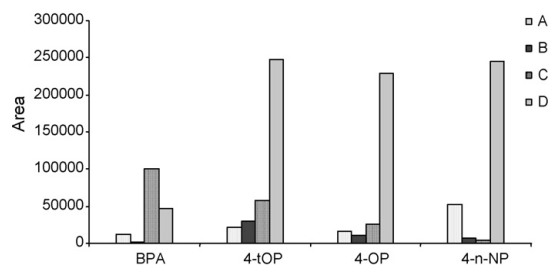


Fig. 2. Influence of the mobile phase modifiers on the signal: without modifier (A), acetic acid 0.05% (B), ammonium acetate 2.5 mM (C) and 0.05% ammonia (D) ($n=2$).

contributes to the ionization of the target compounds, except in the case of BPA (the best modifier for BPA is ammonium acetate). In order to reach a compromise between these situations and achieve the low limits established by Directive 2008/105/EC for alkylphenols, ammonia (0.05%, v/v) was chosen as a modifier.

The influence of the mobile phase flow in the ionization was also studied. Flows between 0.2 and 0.3 mL min⁻¹ were tested. The best result was obtained with a flow of 0.25 mL min⁻¹. No effect on the chromatographic separation was observed.

Finally, a chromatogram of a seawater sample spiked with 1.7 µg L⁻¹ of each compound and 0.5 µg L⁻¹ of surrogate standards

is shown in Fig. 3. A satisfactory separation is achieved in less than 12 min with these LC–MS/MS conditions.

3.2. Optimization of extraction parameters

Several organic solvents (200 µL) with different water miscibility (n-hexane, cyclohexane, dichloromethane, 1,2-dichloroethane, 1-octanol) [10,12,26] were tested as extractants of 30 mL of seawater spiked at a 1.7 µg L⁻¹ level of all compounds of study ($n=2$). Because of their water immiscibility, the organic solvents tend to form a single micro drop when they are added to a water sample; therefore, an agitation (5 min, 1200 rpm) was needed to break down the drop of organic solvent and to improve the dispersion process. After that, centrifugation (3 min at 3500 rpm) was used to separate the two phases again. Finally, extracts were collected and the volume was adjusted to 1 mL with methanol due to the immiscibility of the 1-octanol with the LC mobile phase.

As can be seen in Fig. 4, 1-octanol was the solvent that achieved a quantitative extraction of all compounds (included BPA, which was not extracted by any other solvent). The recoveries obtained with this solvent were higher than 100%, hence the influence of 1-octanol during the ionization was evaluated. The study showed that there was an increase in the signal when 1-octanol was present in the extract. For this reason, the same volume of 1-octanol employed as extractant solvent was added to the standards used for the quantitation. After that, recoveries between 95 and 102% were obtained.

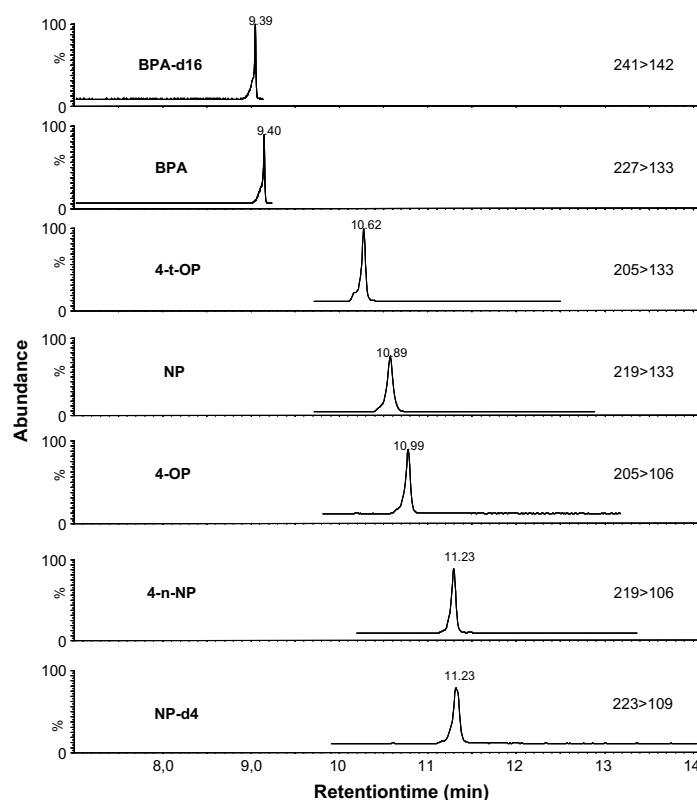


Fig. 3. LC–MS/MS chromatogram of a spiked seawater sample (1.7 µg L⁻¹ of each compound and 0.5 µg L⁻¹ of surrogate standards).

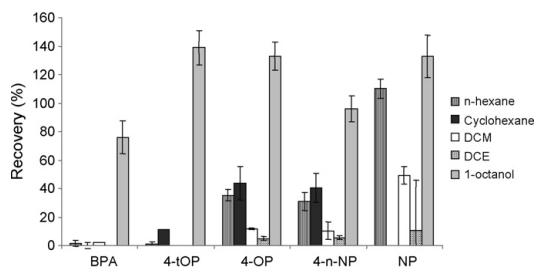


Fig. 4. Selection of extraction solvent in DLLME ($n=2$).

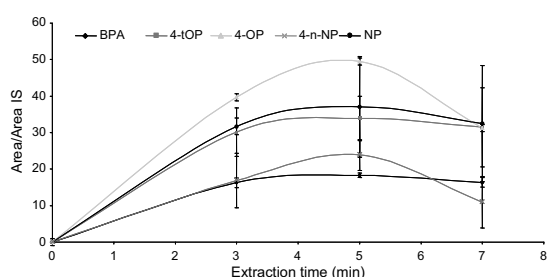


Fig. 5. Effect of DLLME extraction time ($n=2$).

The extraction time (agitation time) was also studied. As observed in Fig. 5, the response was highly increased until 5 min and kept constant after this time. Consequently, 5 min was selected as extraction time.

Finally, the volume of 1-octanol was tested. Different volumes between 50 and 300 μL were assayed and 100 μL were enough to extract analytes (Fig. 6).

3.3. Matrix effect

Ion suppression and enhancement originating from matrix is common in electrospray (ESI); therefore this phenomenon was studied. The slopes of the calibration plots built for standard analytes with 100 μL of 1-octanol ($1\text{--}100\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$) and for the standard additions performed on the seawater samples ($0.03\text{--}3.33\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$) were compared using a test t -Student ($P=95.0\%$) [27]. The statistical

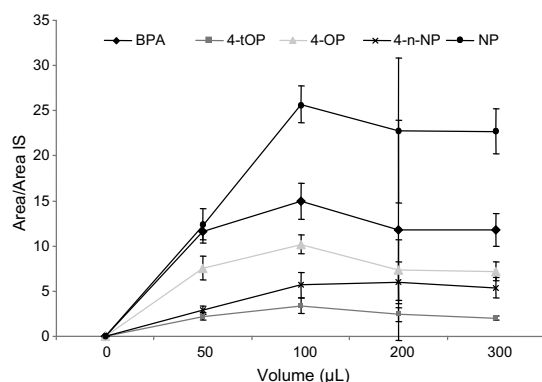


Fig. 6. Effect of extraction solvent volume in DLLME ($n=2$).

test showed that matrix had negative influence (suppression of the signal during the ionization) in the case of BPA, 4-n-NP and NP. Octylphenols did not present matrix effect. Surrogate internal standards (BPA- d_{16} and NP- d_4) were used to compensate this effect and satisfactory results were obtained for all compounds.

3.4. Method validation

There are not certificated reference materials available of these compounds in water, so the figures of merit of the method were evaluated analyzing spiked seawater samples.

Linearity ($r > 0.9989$) was evaluated between 0.09 and 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ using seven calibration points ($n=2$). The response was linear between the MQL and 20 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Precision and accuracy (Table 3) for each compound were determined at three different concentrations levels distributed over the linear range: low, medium and high concentration (0.09, 5 and 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ in seawater samples). To evaluate the accuracy, the analytical recoveries of spiked samples were calculated. As it was explained before, the presence of NP in procedural blank was taken into account and the contribution of NP blank was subtracted from the spiked samples. Mean recoveries ($n=7$) ranged from 84 to 104% for all concentrations and all compounds. The repeatability was calculated as within-day RSD of concentrations, using seven replicates of spiking seawater samples analyzed with the proposed method during the same day and the same analyst and equipment. For intermediate precision, ten replicates of spiked seawater analyzed with the proposed method during different days along two weeks and the same analyst and equipment. In all cases, the repeatability and the intermediate precision of the method were satisfactory, with $\text{RSD} < 10\%$.

Uncertainty of the analytical method was also estimated on the basis of in-house validation data according to EURACHEM/CITAC guide [28] for all compounds at three spiking levels. The main sources of uncertainty were identified and quantified and combined uncertainty (u_c) was calculated as follows:

$$u_c(y) = \sqrt{u_1^2 + u_2^2 + u_3^2}$$

where the uncertainties associated with the spiked sample (u_1), precision (u_2) and accuracy (u_3) were taken into account. The expanded uncertainty (u_{exp}) was estimated using the coverage factor (k) as 2 for a level of confidence of 95%.

$$u_{\text{exp}} = k u_c$$

Due to the fact that validation was carried out using spiked samples (certificate reference materials were not available), the preparation of the standards and the concentration spiked in sample (C_{sample}) had to be considered. The uncertainty associated with the spiked sample (u_1) was calculated considering the contribution of the following factors: standards, pipettes, flask and balance.

$$u_1 = C_{\text{sample}} \sqrt{\left(\frac{S_{\text{standard}}}{C_{\text{standard}}}\right)^2 + \left(\frac{S_{\text{pipette}}}{V_{\text{pipette}}}\right)^2 + \left(\frac{S_{\text{flask}}}{V_{\text{flask}}}\right)^2 + \left(\frac{S_{\text{balance}}}{m_{\text{standard}}}\right)^2}$$

The uncertainty associated with the precision (u_2) was expressed as a relative standard deviation obtained from the intermediate precision ($N=10$).

$$u_2 = \frac{S_{\text{intprec}}}{\sqrt{N}}$$

Finally, the uncertainty associated with accuracy was evaluated. At first, a test t -Student was used to determine whether the mean experimental recovery (X) was significantly different from

Table 3

Recovery, precision and uncertainty of target compounds in seawater with DLLME–LC–MS/MS.

Analyte	Concentration in sample ±Uncertainty ^a (μg L ⁻¹)	Accuracy (%)	Precision (%)	
		Recovery (n = 7)	Repeatability (n = 7)	Intermediate precision (N = 10)
BPA	0.09 ± 0.014	100	9	9
	5 ± 0.97	100	6	8
	20 ± 3.7	104	7	6
4-t-OP	0.09 ± 0.015	84	5	6
	5 ± 1.1	91	9	10
	20 ± 4.5	94	9	9
4-OP	0.09 ± 0.016	96	10	9
	5 ± 1.0	94	5	10
	20 ± 3.2	94	5	10
4-n-NP	0.09 ± 0.009	103	2	3
	5 ± 0.87	91	9	7
	20 ± 2.2	101	3	4
NP	0.09 ± 0.014	101	8	9
	5 ± 0.72	103	9	9
	20 ± 2.7	94	8	4

^a Expanded uncertainty (U) about the mean with coverage factor 2 (95% of confidence).

the theoretical spiked value (μ) of concentration, according to the equation:

$$u_3 = \frac{S_{\text{rec}}}{\sqrt{N}}$$

$$t_{\text{exp}} = \frac{|X - \mu|}{u_3}$$

The t_{exp} values were compared with the 2-tailed theoretical value ($n - 1$ degrees of freedom at 95% of confidence, where n is the number of replicates used to estimate recoveries). If these values are higher or equal than the theoretical value ($t_{4,95\%}$), experimental mean is significantly different from the theoretical spiked value; therefore, the uncertainty associated to the accuracy (u_3) must be taken into account. The t_{exp} values were higher than $t_{4,95\%}$ (1.94) only for alkylphenols at level of concentration of 0.09 μg L⁻¹. Table 4 shows all values of these individual uncertainties, the uncertainty combined and the relative expanded uncertainty (%) of target compounds in seawater at different concentrations.

The method detection limit (MDL) and method quantitation limit (MQL) were estimated as $X_b + 3SD_b$ (X_b average and SD_b

standard deviation of the seven blank seawater samples) and $X_b + 10SD_b$, respectively. In addition, MQL were experimentally verified by spiking seawater sample at a level of concentration close to the estimated of each compound ($n = 5$). Recoveries ranged from 90 to 110% and RSD < 20% therefore the values calculated for the MQL were successfully verified (Table 5).

The MQL obtained allow the determination of 4-t-OP and 4-n-NP at the levels established by the legislation (Directive 2008/105/EC) with satisfactory precision and accuracy. Moreover, in the case of 4-n-NP the MQL is lower than the 30% of the Environmental Quality Standards, which is requested by the Directive 2009/90/EC.

The analytical method proposed for seawater samples was also evaluated for the analysis of alkylphenols and bisphenol A in other types of water (surface and tap water). The use of surrogate standards compensates the possible matrix effect and therefore, adequate results were obtained for both kinds of waters. Precision and accuracy were calculated at one level of concentration (1.5 μg L⁻¹) in order to check the possible applicability of the method. Recoveries obtained ($n = 5$) ranged from 95 to 104% in surface water and from 98 to 105% in tap water. Repeatability was

Table 4Combined (u_c) and relative expanded uncertainties ($u_{\text{exp}}\%$) estimated for each analyte considering the uncertainty associated to the spiked samples (u_1), to the precision (u_2) and to the accuracy (u_3).

Concentration in sample (μg L ⁻¹)	Analyte	u_1	u_2	u_3	u_c	$u_{\text{exp}}\%$
0.09	BPA	0.009	0.002	–	0.019	20.6
	4-t-OP	0.009	0.001	0.002	0.018	20.5
	4-OP	0.009	0.003	0.002	0.019	20.2
	4-n-NP	0.009	0.001	0.002	0.018	20.6
	NP	0.009	0.003	0.003	0.019	21.2
5	BPA	0.50	0.13	–	1.03	20.3
	4-t-OP	0.50	0.18	–	1.06	21.3
	4-OP	0.50	0.14	–	1.03	20.6
	4-n-NP	0.50	0.10	–	1.02	20.0
	NP	0.50	0.13	–	1.03	20.4
20	BPA	2	0.4	–	4.05	20.3
	4-t-OP	2	0.5	–	4.11	20.0
	4-OP	2	0.2	–	3.99	21.9
	4-n-NP	2	0.2	–	4.00	20.6
	NP	2	0.3	–	4.02	20.1

Table 5

Method detection limits (MDL) and method quantitation limits (MQLs) calculated and experimentally verified, precision (RSD%) and recoveries (R%) obtained. Directive 2008/105/EC requirements for each compound.

Compound	Estimated limits		Verified limits			Directive values	
	MDL ($\mu\text{g L}^{-1}$)	MQL ($\mu\text{g L}^{-1}$)	MQL ($\mu\text{g L}^{-1}$)	RSD%	R%	AA ($\mu\text{g L}^{-1}$)	MAC ($\mu\text{g L}^{-1}$)
BPA	0.006	0.020	0.020	9	100	–	–
4-tOP	0.003	0.007	0.008	19	108	0.01	Not applicable
4-OP	0.003	0.006	0.006	10	95	0.01	Not applicable
4-n-NP	0.001	0.003	0.005	15	90	0.3	2
NP	0.010	0.029	0.030	9	104	0.3	2

<10% ($n=5$) in all cases. These values are comparable with previous works [16,18]. Consequently, the method could be used for the analysis of other kinds of water, although more assays are needed in order to complete the validation.

3.5. Comparison with other reported methods

A wide variety of analytical methodologies for the analysis of alkylphenols and bisphenol A in surface and sewage waters can be found in the literature. However, few researches about the analysis of these compounds in seawater samples were reported. As it was said before, sensitive methods are needed in attempt to achieve the low levels set in the Directive 2008/105/EC. As far as we know, the MQLs of the proposed DLLME–LC–MS/MS method are lower than the limits reported in previous works, in which a similar volume of sample was processed [10,17]. When higher volumes of sample were processed, e.g. 500 mL seawater [13,14], 4 L seawater [1] or >40 L seawater [15], MQLs are comparable. Nevertheless, these high volumes hinder the sampling, transport and storage of the samples.

Recovery yields are similar to other methods [29] and even improved in the case of NP; due to the presence of NP in blank analysis, higher recoveries (>120%) were obtained when this contribution is not considered [30]. Furthermore, the precision of the proposed method is comparable to common application in DLLME [10] and better than SPE, LLE or other microextraction techniques [8].

Table 6

Concentrations ($\mu\text{g L}^{-1}$) of alkylphenols and bisphenol A in seawater samples collected from different beaches of A Coruña (NW Spain).

Analyte	C1	C2	C3	C4
BPA	<MQL ^b	0.035	nd ^a	nd ^a
4-t-OP	<MQL ^b	0.11	nd ^a	<MQL ^b
4-OP	nd ^a	0.065	nd ^a	nd ^a
4-n-NP	nd ^a	0.059	nd ^a	nd ^a
NP	0.070	0.14	<MQL ^b	<MQL ^b

^a Not detected.

^b Below method quantitation limit.

3.6. Analysis of seawater samples

In order to demonstrate the feasibility and applicability of the proposed DLLME–LC–MS/MS method some seawater samples obtained from different sites of A Coruña (NW Spain) were analyzed. Sampling points were chosen in order to compare the presence and levels of these compounds in industrial zones (C1 and C2) and urban zones (C3 and C4). These compounds were found at concentrations shown in Table 6.

BPA, 4-OP and 4-n-NP were only detected in industrial zones, whereas NP and 4-tOP were detected in all samples which show the ubiquity of these compounds. The higher concentration was found in sampling point C2 which is close to a wastewater treatment plant (WWTP). These values could be explained considering the degradation process of APEOs. In this sample, 4-n-NP and 4-OP were unexpectedly found, although they were not used in industrial

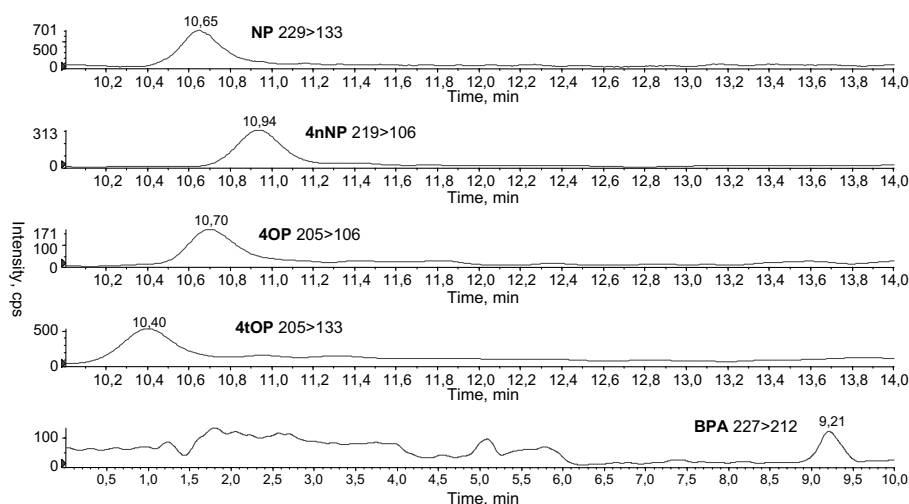


Fig. 7. Chromatogram of a seawater sample (C2) analyzed with the proposed method.

processes; therefore, the linear isomers should be also considered in degradation processes. The chromatogram of sample C2 was shown in Fig. 7. Only the concentration of 4-tOP and 4-OP were higher than the annual average (AA) set in Directive 2008/105/EC.

Not many data of alkylphenols and bisphenol A concentrations in seawater are available in the literature. Concentrations in this study are similar to the reported levels in other coastal zones in Spain [29] and Portugal [30]. However, these levels are lower than concentrations measured in Singapore, Thessaloniki Coast (Greece) and Jamaica Bay [8,20]. The largest population and the industrial activity in these zones can be the main reasons of those high results.

4. Conclusions

The analytical method proposed in this work allows the simultaneous extraction, identification and quantitation of alkylphenols and bisphenol A in seawater. This method is fast and simple and uses small volumes of organic solvent in agreement with the principles of the Green Chemistry. Furthermore, the application of a dispersive liquid–liquid microextraction without any dispersant agent simplifies the experimental process.

With the method proposed, satisfactory reproducibility, accuracy and low limits of quantification were obtained. Using only 30 mL of sample (which facilitates sampling, transport and storage) ultratrace levels of alkylphenols and bisphenol A can be determined allowing the compliance of the Directive 2008/105/EC.

The application of the proposed method to seawater samples proved its practicability. In addition, the presence of APs in some sites was evidenced and the concentration of 4-octylphenols exceeded the environmental quality standards showed in Directive 2008/105/EC. The method was also evaluated for the analysis of surface and tap water and satisfactory results were obtained.

Acknowledgments

This work has been financially supported by Xunta de Galicia (Ref: 09MDS038103-PR). N. Salgueiro-González acknowledges University of A Coruña for Ph.D. grant and G. Fernández-Martínez (SAI-UDC) by the LC–MS/MS support.

References

- [1] J.E. Loyo-Rosales, I. Schmitz-Afonso, C.P. Rice, A. Torrents, *Anal. Chem.* 75 (2003) 4811.
- [2] Y.G. Ahn, J.H. Shin, H.Y. Kim, J. Kim, M.K. Lee, J. Hong, *Anal. Chim. Acta* 603 (2007) 67.
- [3] V. Andreu, E. Ferrer, J.L. Rubio, G. Font, Y. Pico, *Sci. Total Environ.* 378 (2007) 124.
- [4] Directive 2000/60/EC, Establishment and Framework for Community Action in the Field of Water Policy, European Parliament and the Council of the European Union, 2000.
- [5] Directive 2008/105/EC, Environmental Quality Standards in the Field of Water Policy, Amending and Subsequently Repealing Council Directives 82/176/EEC, 83/513/EEC, 84/156/EEC, 84/491/EEC, 86/280/EEC and Amending Directive 2000/60/EC, European Parliament and the Council of the European Union, 2008.
- [6] Commission Directive 2009/90/EC, Technical Specifications for Chemical Analysis and Monitoring of Water Status, European Parliament and the Council of the European Union, 2009.
- [7] G. Gatidou, N.S. Thomaidis, A.S. Stasinakis, T.D. Lekkas, *J. Chromatogr. A* 1138 (2007) 32.
- [8] C. Basheer, H.K. Lee, *J. Chromatogr. A* 1057 (2004) 163.
- [9] M. Kawaguchi, K. Inoue, M. Yoshimura, R. Ito, N. Sakui, H. Nakazawa, *Anal. Chim. Acta* 505 (2004) 217.
- [10] J. López-Darias, M. Germán-Hernández, V. Pino, A.M. Afonso, *Talanta* 80 (2010) 1611.
- [11] L. Brossa, E. Pocurull, F. Borrull, R.M. Marce, *Chromatographia* 56 (2002) 573.
- [12] E. Yiantzi, E. Psillakis, K. Tyrovolas, N. Kalgerakis, *Talanta* 80 (2010) 2057.
- [13] E. Martínez, O. Gans, H. Weber, S. Scharf, *Water Sci. Technol.* 50 (2004) 157.
- [14] T. Benijts, W. Lambert, A. De Leenheer, *Anal. Chem.* 76 (2004) 704.
- [15] I.C. Beck, R. Bruhn, J. Gandrass, W. Ruck, *J. Chromatogr. A* 1090 (2005) 98.
- [16] L. Brossa, E. Pocurull, F. Borrull, R.M. Marce, *Chromatographia* 59 (2004) 419.
- [17] R. Cespedes, S. Lacorte, A. Ginebreda, D. Barcelo, *Environ. Pollut. (Oxford, U.K.)* 153 (2008) 384.
- [18] M. Rezaee, Y. Assadi, M.-R. Hosseini, E. Aghaei, F. Ahmadi, S. Berijani, *J. Chromatogr. A* 1116 (2006) 1.
- [19] Z. Zhang, E. Ohiozebau, S.M. Rhind, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 1203.
- [20] A. David, H. Fenet, E. Gomez, *Mar. Pollut. Bull.* 58 (2009) 953.
- [21] Commission Decision 2002/657/EC, Implementing Council Directive 96/23/EC Concerning the Performance of Analytical Methods and the Interpretation of Results, 2002.
- [22] K. Inoue, M. Wada, T. Higuchi, S. Oshio, T. Umeda, Y. Yoshimura, H. Nakazawa, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 773 (2002) 997.
- [23] T. Benijts, R. Dams, W. Lambert, A. De Leenheer, *J. Chromatogr. A* 1029 (2004) 153.
- [24] I. Schmitz-Afonso, J.E. Loyo-Rosales, M.D. Aviles, B.A. Rattner, C.P. Rice, *J. Chromatogr. A* 1010 (2003) 25.
- [25] B. Shao, H. Han, J.Y. Hu, J. Zhao, G.H. Wu, Y. Xue, Y.L. Ma, S.J. Zhang, *Anal. Chim. Acta* 530 (2005) 245.
- [26] R. Loos, J. Wollgast, J. Castro-Jimenez, G. Mariani, T. Huber, G. Locoro, G. Hanke, C. Umlauf, G. Bidoglio, P. Hohenblum, W. Moche, S. Weiss, H. Schmid, F. Leien-decker, T. Ternes, A.N. Ortega, A. Hildebrandt, D. Barcelo, P. Lepom, I. Dimitrova, O. Nitcheva, S. Polesello, S. Valsecchi, S. Boutrup, O. Sortkjaer, R. de Boer, J. Staeb, *TrAC, Trends Anal. Chem.* 27 (2008) 89.
- [27] F. Gosetti, E. Mazzucco, D. Zampieri, M.C. Gennaro, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 3929.
- [28] S.L.R. Ellison, M. Rosslein, A. Williams, *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurements*. EURACHEM/CITAC, 2000.
- [29] J. Sánchez-Avila, M. Fernández-Sanjuan, J. Vicente, S. Lacorte, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 6799.
- [30] N. Jonkers, A. Sousa, S. Galante-Oliveira, C. Barroso, H. Kohler, W. Giger, *Environ. Res.* 17 (2010) 834.

ANEXO II

Blank and sample handling troubleshooting in ultratrace analysis of
alkylphenols and bisphenol A by liquid chromatography tandem
mass spectrometry

Talanta, 101 (2012) 413-419



Blank and sample handling troubleshooting in ultratrace analysis of alkylphenols and bisphenol A by liquid chromatography tandem mass spectrometry

N. Salgueiro-González^a, E. Concha-Graña^a, I. Turnes-Carou^a, S. Muniategui-Lorenzo^{a,*}, P. López-Mahía^{a,b}, D. Prada-Rodríguez^{a,b}

^a Department of Analytical Chemistry, University of A Coruña, Campus da Zapateira, Rua da Fraga 10, E-15008 A Coruña, Spain

^b University Institute of Environment, Pazo de Lóngora, Liáns, Oleiros E-15179, A Coruña, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 June 2012

Received in revised form

12 September 2012

Accepted 22 September 2012

Available online 8 October 2012

Keywords:

Blank contamination

Sample handling

LC-MS

Alkylphenols

Nonylphenol

Bisphenol A

ABSTRACT

Blank contamination is a notorious problem in the ultratrace analysis of alkylphenols and bisphenol A. The achievement of low detection limits is complicated due to the high background signals. Furthermore, overestimations and underestimations in the analytical results can occur when blank levels are not stable. Thus, a review of sources of blank contamination in this type of analysis was carried out. Several sources of contamination were identified and useful guidelines are proposed for the determination of these compounds in water samples by liquid chromatography coupled with mass spectrometry. The system contamination was maintained below 0.09 ng (reagent blank) for all compounds and below 0.003 $\mu\text{g L}^{-1}$ (procedure blank). The main improvement was obtained by using LC-MS grade solvent in the mobile phase and PTFE syringe filters for the filtration of the sample extracts. Sample handling aspects such as filtration and storage of the water samples were also considered. The filtration of the samples should be avoided because both contamination and adsorption problems were observed when different kinds of filters were assayed. The refrigerated storage of water samples should be limited to 5 days (without addition of methanol) or 8 days (with 5% methanol).

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Alkylphenols (APs) and bisphenol A (BPA) are of increasing concern because of their endocrine disrupting properties [1]. APs are the degradation products of the non-ionic surfactants AP polyethoxylates (APEs), which are widely used worldwide in agricultural, industrial and domestic applications. Furthermore, these compounds are used as plasticizers in high density polyethylene (HDPE), polyethylene terephthalate (PET) and polyvinyl chloride (PVC) [2] and also in the manufacture of textiles, paper and agricultural chemical products.

Nonylphenol (NP), which is a technical mixture of 211 branched nonyl-chain isomers (~90% *para*-nonylphenols (4-NPs)), and 4-*tert*-octylphenol (4-tOP) are the most important alkylphenols due to their toxicological properties [3].

Bisphenol A (BPA) has been used as a material for the production of epoxy resins, phenol resins, polycarbonates, polyesters, lacquer coatings on food cans, and also in flame retardants, adhesives, and as a component of electronic circuits [4].

The behaviour of APs and BPA as xenoestrogens and their frequent presence in the environment mean that these compounds are highly regulated. The new European water legislation, Directive 2008/105/EC [5], establishes very strict environmental quality standards (EQS) for the presence of 4-NP (2 $\mu\text{g L}^{-1}$ maximum level and 0.3 $\mu\text{g L}^{-1}$ annual average) and 4-*tert*-octylphenol (0.1 $\mu\text{g L}^{-1}$ and 0.01 $\mu\text{g L}^{-1}$ annual average) in surface waters. Bisphenol A is included in Annex II of the Directive 2008/105/EC as a substance to be regulated in the future.

In order to confirm the required low levels of the aforementioned compounds, very selective and sensitive analytical methods are necessary. The chromatographic determination of these compounds is performed by either liquid chromatography (LC) [4,6–8] or gas chromatography (GC) [9–13] coupled with mass spectrometry detection. Due to the polarity and low volatility of alkylphenols, analysis by GC requires in most cases the derivatization of the compounds to obtain good chromatographic peaks and good precision [14]. For this reason, the technique most frequently used for the determination of APs and BPA is liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS) [8,15,16].

'Blank' contamination problems, i.e., large peaks observed even without a sample (procedure blank), are often encountered during the analysis of alkylphenols (especially NP) and BPA. This blank

* Corresponding author. Tel.: +34 981 167000; fax: +34 981 167065.
E-mail address: smuniat@udc.es (S. Muniategui-Lorenzo).

contamination could result in the high detection limits. Blank subtraction does not always correct blank problems efficiently. When these blanks do not remain constant, the subtraction can cause quantitation errors. Consequently, it is important to maintain the blank contamination as low as possible, below a critical value.

There are numerous factors that could contribute to the presence of blank contamination in AP and BPA analysis. As pointed out before, AP and BPA are used in the manufacture of plastics and therefore, the use of plastic materials should be avoided in all steps of the analytical determination. AP polyethoxylates are also used in the fabrication of cleaning products, and for this reason it is also important to avoid the use of detergents in the cleaning of laboratory glassware in order to reduce blank contamination problems.

NP can also be present in laboratory air. For example, concentrations of 64 ng m^{-3} for 4-tOP and 103 ng m^{-3} for NP were found in the air of a typical laboratory [17] and it has also been reported that an LC-MS vial with fresh MeOH left in the auto-sampler of the instrument can absorb NP from the laboratory air within weeks [3]. Septa vials and solvents used as mobile phases can also cause blank contamination [17]. BPA contamination was observed in ultrapure water and this was caused by the water purification system [18,19]. Certain components of the LC instrument, such as mobile phase plastic tubes and connections, could be another important source of contamination [20,21].

Sampling, storage of samples, filtration and sample treatment are also important sources of blank contamination. APs and BPA in water samples are commonly extracted by LLE [11] or solid-phase extraction (SPE) [7,12,15,22,23], but this procedure can also cause contamination due to the plastic materials of the SPE cartridges [3], the multiple steps involved and the use of relatively high volumes of solvents. Nowadays SPE is being replaced by other techniques like solid-phase microextraction (SPME) [24,25], dispersive liquid liquid microextraction (DLLME) [26] and stir bar sorptive extraction (SBSE) [10,27,28]. These techniques minimize the waste of organic solvents and simplify the extraction process (fewer steps), in accordance with the principles of Green Analytical Chemistry [29]. As a result, the sources of contamination are also reduced.

In this work a study of blank contamination problems in all the steps involved in the ultratrace analysis of APs and BPA in water samples was carried out. A literature review was performed and, although some papers mentioned blank contamination problems in the analysis of these compounds, to the best of our knowledge this is the first study that considers in detail several sources of contamination and proposes different guidelines to minimize blank problems. In fact, a considerable improvement in the procedure blanks was achieved by following these guidelines ($< 0.003 \mu\text{g L}^{-1}$). In this way, a smaller volume of water sample is needed to achieve the low limits required and green analytical methods could be applied. In this case, the extraction of aqueous samples was carried out by DLLME, thus reducing the sample manipulation and consequently the sources of contamination. Furthermore, sample handling aspects such as filtration and storage of the aqueous samples were considered. Although the paper is focused on the analysis of aqueous samples, some of the points studied – such as instrument blank contamination, cleaning of material and filtration of extracts – are also applicable in the analysis of AP and BPA in any kind of liquid or solid sample.

2. Experimental

2.1. Chemicals and reagents

Nonylphenol technical mixture (NP) (94% purity, $\pm 1\%$ tolerance) and 4-*n*-nonylphenol (4-*n*-NP) (99.9% purity, $\pm 0.5\%$ tolerance) were

obtained from Riedel-de Haën (Seelze, Germany). Bisphenol A (BPA) (99% purity, $\pm 0.5\%$ tolerance), 4-*tert*-octylphenol (4-tOP) (97% purity, $\pm 0.5\%$ tolerance) and 4-octylphenol (4-OP) (99% purity, $\pm 0.5\%$ tolerance) were obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). All standard solutions (1000 , 10 and 1 mg L^{-1}) containing the aforementioned compounds were prepared in methanol (SPS grade) from Romil Ltd. (Cambridge, United Kingdom) and stored at 4°C . As surrogate internal standards, 4-*n*-nonylphenol-2,3,5,6- d_4 (NP- d_4) (99.3%) was obtained from CDN Isotopes (Pointe-Claire, Canada) and a solution of bisphenol A- d_{16} (BPA- d_{16}) (99.5%) in acetonitrile (100 mg L^{-1}) was supplied by Dr. Ehrenstorfer GMBH (Augsburg, Germany).

For the determination, HPLC grade methanol, LC-MS PAI methanol and ammonia (30%) for instrumental analysis were obtained from Panreac (Barcelona, Spain). Water was purified with a Direct 5 Milli Q system (Millipore, Bedford, MA, USA). For the extraction, Chromasolv[®] 1-octanol (HPLC grade, 99%) was obtained from Sigma-Aldrich Co. (Madrid, Spain). Seawater samples were used for the sample handling assays.

Glass vials with a white screw cap with bonded PTFE/silicone septa (Waters, Milford, MA, USA) were used for the injection. The syringe filters tested were as follows: Iso-Disc[™] N-13-2, (nylon $0.2 \mu\text{m}$) supplied by Supelco (Bellefonte, PA, USA), PTFE (polytetrafluoroethylene) $0.2 \mu\text{m}$ filter (Teknokroma, Barcelona, Spain), and PVDF (polyvinylidene fluoride) $0.45 \mu\text{m}$ Millex[®] HV (Millipore, Carrigtwohill, Ireland).

Filtration assays of samples were carried out using $0.6 \mu\text{m}$ glass fibre filters MN GF-6 (Macherey Nagel, Düren, Germany), $0.45 \mu\text{m}$ cellulose nitrate-acetate filters and GNWP $0.2 \mu\text{m}$ nylon membrane filters (Millipore, Bedford, MA, USA).

2.2. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry

LC separation was performed using an Agilent HP-1200 Series LC system fitted with an autosampler (injected volume $25 \mu\text{L}$), a binary solvent pump and a thermostatic column oven. The chromatographic separation was carried out with a Hypersil Gold C_{18} column ($150 \times 2.1 \text{ mm}$, $3 \mu\text{m}$, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), using a mobile phase consisting of A (water) and B (methanol) both with 0.05% of ammonia as modifier. The initial equilibrium time was 7 min at $20\% \text{ B}$. The gradient was then performed as follows: $20\% \text{ B}$ during 1 min ; increased from 20% to $40\% \text{ B}$ from 1 min to 4 min ; hold at $100\% \text{ B}$ from 4 to 12 min and return to initial conditions in 2 min . The total run time was 14 min . The flow rate was $0.250 \text{ mL min}^{-1}$ and the oven temperature was set at 40°C .

The MS/MS determination was performed in an API 3200 triple quadrupole mass spectrometer (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). The system was equipped with an APCI/ESI source from Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA). Optimisation of MS/MS settings was performed by an automatic function of the MS software (Analyst 1.4 Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) using a direct infusion of individual standard solutions. APs and BPA were analysed by electrospray ionization in negative ion mode. The ion spray voltage was set at the maximum level (-4500 V). The relevant instrument settings for each compound are shown in Table 1 [30]. In the case of BPA- d_{16} , the parent ion was 243 instead of 244 because this compound becomes BPA- d_{15} in water [31].

2.3. Extraction and quantitation

Water samples were analysed by dispersive liquid-liquid microextraction [30]. In brief, the sample (30 mL) was placed in a glass centrifugation tube and extracted with $100 \mu\text{L}$ of 1-octanol on a Vibrax-VXR agitation plate (IKA, Staufen, Germany) during

5 min at 1200 rpm. Separation of two phases occurred upon centrifugation (Eppendorf 5804, Madrid, Spain) at 3500 rpm for 3 min. The fine droplets of 1-octanol were collected and the volume was adjusted to 1 mL with methanol due to the immiscibility of the 1-octanol with the LC mobile phase. Finally, the extract was passed through a 0.45 μm PTFE syringe filter prior to injection into the HPLC system.

Quantitation was carried out using the deuterated compounds as internal standards in blank assays and as surrogate standards in the analysis of samples.

3. Results and discussion

3.1. Cleaning of laboratory glassware

The effective cleaning of laboratory glassware is mandatory in order to reduce blank problems. It is known that detergents should be avoided in the analysis of APs and BPA; however, there is a lack of agreement in the literature concerning the cleaning of glassware for routine analysis. The most frequent cleaning process involves rinsing with water and then with an organic solvent (typically acetone) followed by baking the glassware (except for volumetric glassware) for 2 h at 400 °C [32] or 4 h [23] or more than 8 h at 120 °C [7], 320 °C [33] or 450 °C [17]. Alternative approaches include cleaning with AP-13 Extran alkaline soap, rinsing with acetone and water and then baking at 110 °C

overnight [34] or cleaning with chromic acid [35]. UNE EN 18857-1 Standard Method proposes the cleaning of glassware by rinsing with acetone or baking at 250 °C for 2 h [11].

In this work, three different glassware cleaning procedures were evaluated: (i) cleaning with alkaline soap (24 h) and then rinsing with milli-Q water, acetone and methanol; (ii) cleaning with solvents: acetone and methanol; or (iii) rinsing with acetone, baking at 350 °C overnight and rinsing with methanol in order to remove possible residues of calcination.

The glassware cleaned by each of the three procedures was then used for the analysis of blank water samples, using the procedure described above, and the obtained extracts ($n=2$) were injected into the LC-MS system.

As can be seen in Fig. 1, blank contamination is too high for 4-tOP, NP and BPA whereas it is minimal for 4-OP and 4-*n*-NP. All of the cleaning procedures gave similar results in the case of alkylphenols. However, in the case of BPA, higher blank contamination was observed when cleaning was carried out with soap. Rinsing with acetone and methanol was chosen as cleaning procedure because this is the fastest and simplest protocol that gives low blanks.

3.2. LC-MS system: instrument blanks

As mentioned in the introduction, the LC-MS system itself can be a source of contamination in the analysis of plasticizers.

Table 1
Parent and fragment ions, retention times and MS/MS parameters for each compound.

Analyte	Retention time (min)	Precursor ion (m/z)	Product ions (m/z)	Decustering potential (V)	Collision energy (V)
BPA	9.40	227 [M–H] [–]	212* 133	–40	–24 –32
BPA-d ¹⁶	9.39	241 [M–D] [–]	142* 221	–45	–44 –46
4-tOP	10.62	205 [M–H] [–]	133* 116	–45	–30 –76
NP	10.89	219 [M–H] [–]	133* 116	–40	–38 –74
4-OP	10.99	205 [M–H] [–]	106* –	–50	–26 –
4- <i>n</i> -NP	11.23	219 [M–H] [–]	106* 119	–45	–28 –44
NP-d ⁴	11.23	223 [M–D] [–]	109* 129	–45	–28 –46

* Quantitation ion.

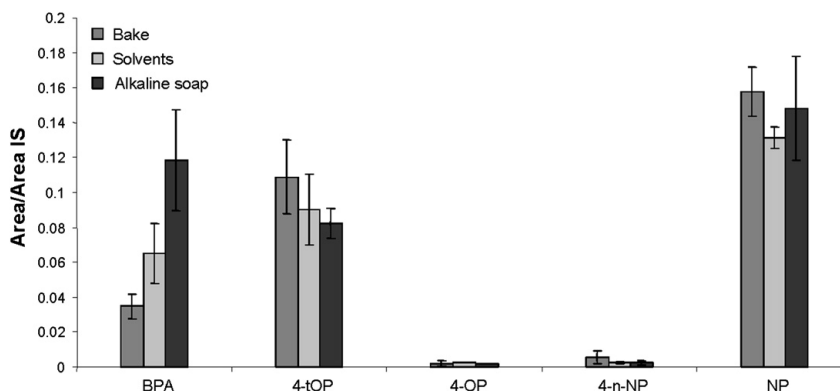


Fig. 1. Influence of the glassware cleaning method on the blank contamination.

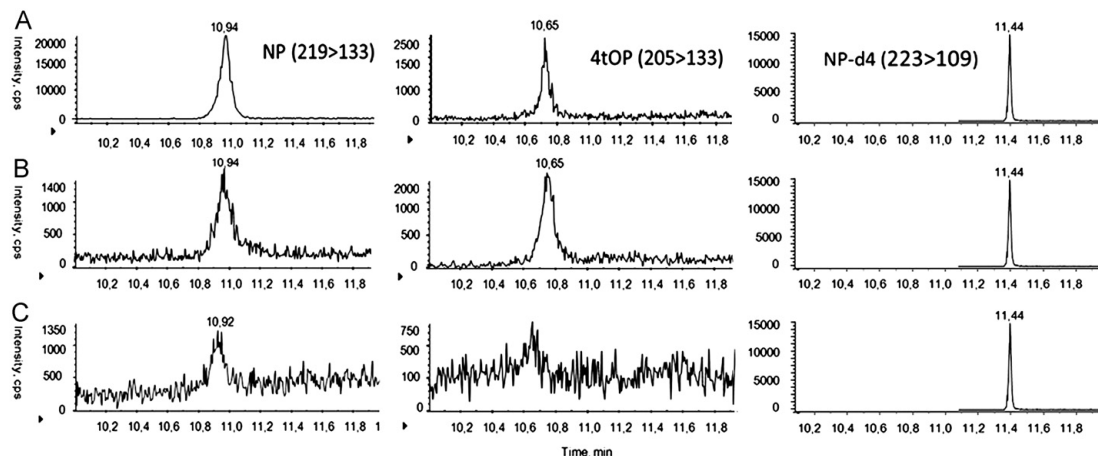


Fig. 2. Chromatograms for the analysis of 20 µL of methanol at initial conditions (A), when the water purification system was changed (mobile phase) (B), and using LC-MS grade methanol as the mobile phase (C).

According to the literature, septa vials, mobile phase plastic tubing and connectors [20,21] and solvents [3] could be sources of blank contamination in the analysis of these compounds. Recently, some authors employed an additional isolator column attached before the injection valve to separate background contaminants [36]. However, this proposal can produce loss of sensitivity and asymmetric peaks (with tails and/or fronts). Moreover, overpressures and clogging can occur; consequently, greater system maintenance is required. In order to minimize the blank signal and avoid these disadvantages, other cheaper and simpler alternatives were considered, taking into account all sources of contamination.

Substantial peaks for alkylphenols (especially NP) were initially observed when 20 µL of methanol (reagent blank) was directly injected into the HPLC-MS/MS system. Three replicates of reagent blank were carried out and an average concentration of 2.2 ng for 4-*t*-OP and 26 ng for NP were obtained. The chromatogram of one of these injections was shown in Fig. 2A. BPA, 4-*t*-OP and 4-*n*-NP were not detected. In order to evaluate the main sources of contamination and reduce reagent blanks, the previously mentioned LC-MS sources were studied.

Septa vials were evaluated as a possible source of this contamination. Methanol samples from a vial with a PTFE/silicone septum and from a vial without a septum were injected and compared. Significant differences were not observed between the two experiments and therefore, septa vials were ruled out as a source of blank contamination.

Moreover, an instrument blank (run without injection) was performed in the same conditions and differences between this injection and the MeOH injection (reagent blank) were not detected; consequently, it can be concluded that contamination is originated in the LC system itself.

After that, mobile phase solvents were tested. HPLC grade methanol and water from a Milli-Q Gradient A10/Elix water-purification system were the mobile phases used in the experiments represented in Fig. 2A. The water purification system was replaced by a Milli-Q Direct 5 system, which minimizes the contact with plastic reservoirs. As can be seen from the chromatogram in Fig. 2B, the blank reduction was considerable, with peaks for 4-*tert*-octylphenol and nonylphenol that correspond to an average concentration ($n=3$) of 0.15 ng and 1.6 ng, respectively. LC-MS quality solvents were also tested as the mobile phase. A reduction in blanks

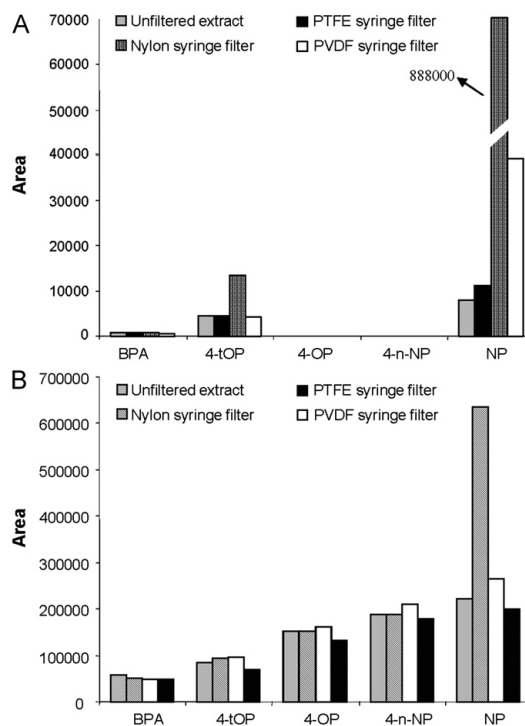


Fig. 3. Study of different syringe filters. Blanks obtained (A) and adsorption of APs and BPA on filters (B).

was not observed when milli-Q water was replaced by the LC-MS grade water. Nevertheless, a significant decrease in the 4-*tert*-octylphenol peak area was obtained when LC-MS grade methanol was used, and the nonylphenol was reduced to 0.09 ng ($n=3$), as it was shown in Fig. 2C.

In the final part of this study, the LC mobile phase tubing and connectors were tested. In order to evaluate the possible contribution of the tube material, Teflon[®] tubes were replaced by PEEK tubes. This change did not lead to an effect on the NP blank signal.

3.3. Filtration prior to LC-MS injection

Even sample solutions that appear to be particulate-free can contain small amounts of solids that can clog the pores of the LC column inlet frit. In an effort to prevent this problem, solutions are commonly filtered prior to injection into the LC system. Syringe filters that have been used in the analysis of alkylphenols include hydrophilic polypropylene membrane filters (GHP Acro-disc, 0.45 μm) [37] and polyvinylidene fluoride filters (PVDF, 0.2 μm) [23].

A study of the blank contamination and losses caused by the syringe filters was carried out in order to identify the most appropriate filter. The syringe filters assayed in this work were 0.2 μm nylon, 0.2 μm PTFE and 0.45 μm PVDF (polyvinylidene fluoride) Fig. 3.

Blank water samples ($n=2$) were extracted according to the procedure outlined in the experimental section. One of the samples was unfiltered and the others were passed through the

filters listed above. As can be observed in Fig. 3A, contaminated blanks of NP were obtained with nylon and PDVF filters.

The adsorption of compounds on the filters was evaluated. Blank samples ($n=2$) were extracted and the organic extracts (1 mL) were spiked with APs and BPA at a concentration of $1.7 \mu\text{g L}^{-1}$ and then filtered through each of the filters. The results of these assays were compared with the result obtained when a spiked water sample at the same concentration level was extracted but not filtered (Fig. 3B). Significant retention was not observed with any of the filters assayed. PTFE filters were finally selected because they gave similar results to the unfiltered samples and provided the lowest blanks without retention of the compounds.

3.4. Analysis of water samples: procedural blanks and other aspects

3.4.1. Storage of samples

According to the literature, samples are commonly stored in a refrigerator at 4°C prior to analysis. The maximum reported storage time varied between studies, with times of 24 h [23,38–40], 48 h [14,33], a week [41] or unspecified [10,22,27,28,42,43]. In order to evaluate the degradation of the APs and BPA in seawater samples and to determine the maximum permissible storage time, a stability study was carried out.

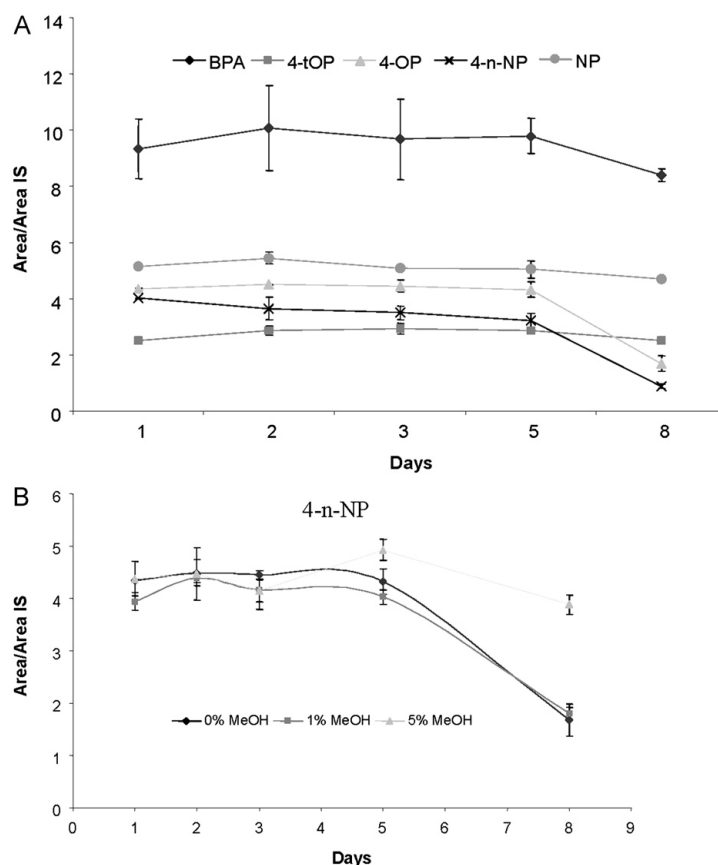


Fig. 4. Study of storage of samples ($n=2$) without additives (A) and with different percentages of methanol added for 4-n-NP (B).

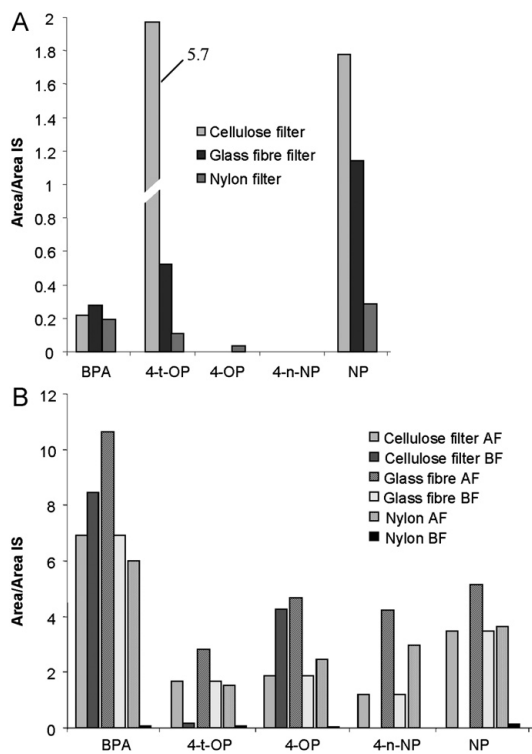


Fig. 5. Study of the filtration of samples: Blanks obtained (A) and adsorption of APs and BPA to different filters (B).

Ten aliquots of a seawater sample ($n=2$) were spiked with alkylphenols and bisphenol A at a level of $1.7 \mu\text{g L}^{-1}$ and then refrigerated at 4°C . Two aliquots were analysed immediately (day 1), after 24 h (day 2), after 48 h (day 3), after 5 days and after a week (day 8). As can be seen in Fig. 4A, the response remains almost constant for all the alkylphenols until day 5. However, a sharp decrease ($\sim 30\%$) in the response was observed at day 8 for 4-OP and 4-n-NP. This decrease could be due to sorption problems or degradation of the compounds under investigation.

In order to avoid adsorption of the compounds onto the glassware, some authors add methanol to the water samples as a modifier or acidify the samples to pH 2.5–3. The percentage of methanol added varies between 0.1% and 10% depending on the author. Typical methanol percentages reported are 5% [22,44] and 0.1% [4], whereas some authors do not add any modifier at all [10,15,23,33,39,45].

Therefore, in order to assess the possible sorption of 4-OP and 4-n-NP onto containers, the experiment was repeated ($n=2$) with a small percentage (1% and 5%) of methanol added as a modifier. The results of this experiment are shown in Fig. 4B. The addition of 5% of methanol could reduce the adsorption. Nevertheless, the presence of methanol in the sample can also affect the DLLME extraction efficiency; methanol can modify the analyte-extraction solvent partition or the separation between the aqueous and organic phases. In this particular case, the addition of a modifier is not recommended and the maximum storage time should be less than 5 days in order to avoid analyte losses.

3.4.2. Filtration of samples

There is no general consensus in the literature concerning the prefiltration of water samples prior to analysis. The use of different kinds of filters has been reported and in some cases filtration is not carried out. Glass fibre filters ($0.7 \mu\text{m}$) are the most frequently used, along with glass microfibre prefilters ($1 \mu\text{m}$) [23] or with $0.45 \mu\text{m}$ membrane filters [22,46]. Other pore sizes used in glass fibre filters are $1 \mu\text{m}$ [16,32] and $1.2 \mu\text{m}$ [27,45]. Membrane filters ($0.45 \mu\text{m}$) [39–41], cellulose filters ($0.45 \mu\text{m}$) [42,47] and nylon filters ($0.45 \mu\text{m}$) [33] are other alternatives.

The contribution of the prefiltration step to the procedural blanks was evaluated along with possible losses of compounds due to adsorption on the filter. Three different filters were assayed: $0.45 \mu\text{m}$ cellulose filters, $0.2 \mu\text{m}$ nylon filters and $0.6 \mu\text{m}$ glass fibre filters. A volume of 100 mL of water sample ($n=2$) was filtered using each filter and then extracted according to the procedure described in Section 2.3. The relative signals of the blanks obtained with each kind of filter are shown in Fig. 5A. It can be seen that the highest blank was obtained with the cellulose filters, especially for 4-*tert*-octylphenol and nonylphenol. The lowest blank was obtained with the nylon filter.

The possible losses caused by the filtration were evaluated by comparison of the results obtained when a spiked water sample was filtered and then extracted with those obtained when a water sample was filtered and then spiked before the extraction ($n=2$). The results are shown in Fig. 5B. Nylon filters gave rise to a high level of retention of all the analytes ($> 95\%$), whereas cellulose filters retained 4-n-NP (72%) and 4-*t*-OP (60%). The lowest retention was obtained with the glass fibre filters ($\sim 40\%$).

Bearing in mind the retention of the target compounds and the contaminated blanks obtained with all the filters assayed, the use of filters was discarded and prefiltration of samples is not recommended.

4. Concluding remarks

Nonylphenol, 4-*tert*-octylphenol and bisphenol A are compounds that are affected a great deal by blank contamination. In this work, the main contamination sources in DLLME-LC-MS/MS were considered and $> 90\%$ of the contamination could be removed by following the guidelines described here.

The importance of avoiding the use of plastic material in any step of the analysis was demonstrated, even in the water purification system. The use of detergents should be also avoided. The cleaning of the glassware with milli-Q water, acetone and methanol before using is proposed as a cleaning procedure for routine analysis.

A significant reduction in 4-*tert*-octylphenol blanks was achieved using LC-MS grade methanol in the mobile phase, but an improvement was not observed using LC-MS quality water. The use of $0.2 \mu\text{m}$ PTFE syringe filters is recommended because these gave lower blanks. The reduction of reagent blanks observed on employing these conditions ($< 0.09 \text{ ng}$) provides increased sensitivity in alkylphenols and bisphenol A determination and allows low detection limits to be achieved.

The considerations outlined above could be applied to the analysis of these compounds in any liquid or solid samples. Moreover, the following recommendations should be considered in the analysis of water samples in order to reduce procedure blanks.

The addition of 5% MeOH to water samples is recommended in order to avoid adsorption of the compounds onto the glassware. In this way, samples can be stored in a refrigerator at 4°C for at least a week. When the addition of methanol is not possible

because of the extraction procedure selected, the maximum storage time is decreased to 5 days in order to avoid losses of compounds.

Filtration of the water samples is not recommended because of the high blank signal caused by the filters assayed and the retention of compounds by the filter (<40% in the best case). When the prefiltration is mandatory (because of the extraction method selected or the presence of particulates), the use of glass fibre filters is recommended. In this case, the filter should also be extracted in order to recover all of the compounds and the blanks should also be taken into account.

Low blank contamination and low detection limits could be achieved in the analysis of water samples. The procedure blanks were minimized and were kept below $0.003 \mu\text{g L}^{-1}$. Consequently, the low limits established for APs in the Directive 2008/105/EC were achieved.

Acknowledgements

This work was financially supported by the Xunta de Galicia (09MDS038103PR). N. Salgueiro acknowledges The University of A Coruña for a Ph.D grant. The authors wish to thank G. Fernández-Martínez (SAI-UDC) for his support.

References

- [1] M. Iwata, Y. Eshima, H. Kagechika, H. Miyaura, *Immunol. Lett.* 94 (2004) 135–139.
- [2] J.E. Loyo-Rosales, G.C. Rosales-Rivera, A.M. Lynch, C.P. Rice, A. Torrents, *J. Agr. Food Chem.* 52 (2004) 2016–2020.
- [3] R. Loos, J. Wollgast, J. Castro-Jimenez, G. Mariani, T. Huber, G. Locoro, G. Hanke, G. Umlauf, G. Bidoglio, P. Hohenblum, W. Moche, S. Weiss, H. Schmid, F. Leidecker, T. Ternes, A.N. Ortega, A. Hildebrandt, D. Barcelo, P. Lepom, I. Dimitrova, O. Nitcheva, S. Polesello, S. Valsecchi, S. Boutrup, O. Sortkjaer, R. de Boer, J. Staeb, *Trac-Trend. Anal. Chem.* 27 (2008) 89–95.
- [4] H. Gallart-Ayala, E. Moyano, M.T. Galceran, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 3511–3518.
- [5] Directive 2008/105/EC of Parliament and of the Council of 16 December 2008 on environmental quality standards in the field of water policy, amending and subsequently repealing Council Directives 82/176/EEC, 83/513/EEC, 84/156/EEC, 84/491/EEC, 86/280/EEC and amending Directive 2000/0/EC of the European parliament and of the Council (2008).
- [6] R. Loos, G. Hanke, G. Umlauf, S.J. Eisenreich, *Chemosphere* 66 (2007) 690–699.
- [7] E. Martínez, O. Gans, H. Weber, S. Scharf, *Water Sci. Technol.* 50 (2004) 157–163.
- [8] M. Careri, L. Elviri, A. Mangia, I. Zagnoni, *Chromatographia* 57 (2003) 321–327.
- [9] J.A. Padilla-Sanchez, P. Plaza-Bolanos, R. Romero-Gonzalez, A. Garrido-Frenich, J.L.M. Vidal, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 5724–5731.
- [10] M. Kawaguchi, K. Inoue, M. Yoshimura, R. Ito, N. Sakui, H. Nakazawa, *Anal. Chim. Acta* 505 (2004) 217–222.
- [11] UNE-EN ISO 18857-1. Water quality: Determination of selected alkylphenols. Part 1. Method for non-filtered samples using liquid-liquid extraction and gas chromatography with mass selective detection (2007).
- [12] International Standard Organization, ISO/CD 18857-2. Water quality: Determination of selected alkylphenols. Part 2: Gas chromatographic-mass spectrometric determination of alkylphenols, their ethoxylates and bisphenol A in non-filtered samples following solid-phase extraction and derivatisation (2009).
- [13] E. Stottmeister, O.P. Heemken, P. Hendel, G. Donnevert, S. Frey, H. Allmendinger, G. Sawal, B. Jandel, S. Geiss, R. Donau, A. Koch, I. Heinz, M. Ottaviani, E. Veschetti, W. Hartl, C. Kubwabo, C. Benthé, V. Tobinski, H. Woldmann, R. Spilker, *Anal. Chem.* 81 (2009) 6765.
- [14] G. Gatidou, N.S. Thomaidis, A.S. Stasinakis, T.D. Lekkas, *J. Chromatogr. A* 1138 (2007) 32–41.
- [15] L. Brossa, E. Pocurull, F. Borrull, R.M. Marce, *Chromatographia* 59 (2004) 419–423.
- [16] I.C. Beck, R. Bruhn, J. Gandrass, W. Ruck, *J. Chromatogr. A* 1090 (2005) 98–106.
- [17] Z.Y. Xie, J. Selzer, R. Ebinghaus, A. Caba, W. Ruck, *Anal. Chim. Acta* 565 (2006) 198–207.
- [18] S. Berkner, G. Streck, R. Herrmann, *Chemosphere* 54 (2004) 575–584.
- [19] Y.S. Choi, S. Cho, C. Lee, H.M.D. Luu, J. Guo, *Talanta* 94 (2004) 353.
- [20] A.M. Weremiuik, S. Gerstmann, H. Frank, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 2251–2255.
- [21] A.S. Lloyd, V.A. Bailey, S.J. Hird, A. Routledge, D.B. Clarke, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23 (2009) 2923–2938.
- [22] T. Benijts, W. Lambert, A. De Leenheer, *Anal. Chem.* 76 (2004) 704–711.
- [23] J.E. Loyo-Rosales, I. Schmitz-Afonso, C.P. Rice, A. Torrents, *Anal. Chem.* 75 (2003) 4811–4817.
- [24] M.J. Huang, G.B. Jiang, Y.Q. Cai, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 2218–2224.
- [25] J. Lopez-Darias, V. Pino, Y.J. Meng, J.L. Anderson, A.M. Afonso, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 7189–7197.
- [26] A. Zgola-Grzeskowiak, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 1761–1766.
- [27] P. Richter, C. Leiva, C. Choque, A. Giordano, B. Sepulveda, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 8598–8602.
- [28] S. Nakamura, S. Daishima, *J. Chromatogr. A* 1038 (2004) 291–294.
- [29] J. Namiesnik, *J. Sep. Sci.* 24 (2001) 151–153.
- [30] N. Salgueiro-González, E. Concha-Graña, I. Turnes-Carou, S. Munategui-Lorenzo, P. López-Mahía, D. Prada-Rodríguez, *J. Chromatogr. A* 1223 (2012) 1–8.
- [31] K. Inoue, M. Wada, T. Higuchi, S. Oshio, T. Umeda, Y. Yoshimura, H. Nakazawa, *J. Chromatogr. B* 773 (2002) 997.
- [32] Y. Liu, Y.T. Guan, N.F.Y. Tam, T. Mizuno, H. Tsuno, W.P. Zhu, *Water Air Soil Pollut.* 209 (2010) 333–343.
- [33] R. Brix, C. Postigo, S. Gonzalez, M. Villagrasa, A. Navarro, M. Kuster, M.J.L. de Alda, D. Barcelo, *Anal. Bioanal. Chem.* 396 (2010) 1301–1309.
- [34] Y.C. Fiamegos, C.D. Stalikas, *Anal. Chim. Acta* 597 (2007) 32–40.
- [35] I. Jiménez-Díaz, O. Ballesteros, A. Zafra-Gómez, G. Crovetto, J.L. Vilchez, A. Navalon, C. Verge, J.A. deFerrer, *Chemosphere* 80 (2010) 248–255.
- [36] Y.M. Niu, J. Zhang, Y.N. Wu, B. Shao, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 5248.
- [37] I. Schmitz-Afonso, J.E. Loyo-Rosales, M.D. Aviles, B.A. Rattner, C.P. Rice, *J. Chromatogr. A* 1010 (2003) 25–35.
- [38] E. Yiantzi, E. Psillakis, K. Tyrovolas, N. Kalgerakis, *Talanta* 80 (2010) 2057–2062.
- [39] R. Cespedes, S. Lacorte, A. Ginebreda, D. Barcelo, *Environ. Pollut.* 153 (2008) 384–392.
- [40] M. Petrovic, D. Barcelo, *J. AOAC Int.* 84 (2001) 1074–1085.
- [41] S. Luo, L. Fang, X. Wang, H. Liu, G. Ouyang, C. Lan, T. Luan, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 6762–6768.
- [42] J.F. Liu, X. Liang, G.B. Jiang, Y.Q. Cail, Q.X. Zhou, G.G. Liu, *J. Sep. Sci.* 26 (2003) 823–828.
- [43] J. López-Darias, M. Germán-Hernández, V. Pino, A.M. Afonso, *Talanta* 80 (2010) 1611–1618.
- [44] S. Boitsov, S. Meier, J. Klungsøyr, A. Svardal, *J. Chromatogr. A* 1059 (2004) 131–141.
- [45] C. Guitart, J.W. Readman, *Anal. Chim. Acta* 658 (2010) 32–40.
- [46] T. Benijts, R. Dams, W. Lambert, A. De Leenheer, *J. Chromatogr. A* 1029 (2004) 153–159.
- [47] A.R. Fischer, N.T. Phuong Lan, C. Wiedemann, P. Heide, P. Werner, A.W. Schmidt, G. Theumer, H.-J. Knölker, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2950–2955.

ANEXO III

Membrane assisted solvent extraction coupled with liquid chromatography tandem mass spectrometry applied to the analysis of alkylphenols in water samples

J Chromatogr A, 1281 (2013) 46-53



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Chromatography A

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chroma

Membrane assisted solvent extraction coupled with liquid chromatography tandem mass spectrometry applied to the analysis of alkylphenols in water samples

N. Salgueiro-González^a, I. Turnes-Carou^a, S. Muniategui-Lorenzo^{a,*}, P. López-Mahía^{a,b}, D. Prada-Rodríguez^{a,b}

^a Department of Analytical Chemistry, University of A Coruña, Campus da Zapateira, Rúa da Fraga 10, E-15008 A Coruña, Spain

^b University Institute of Environment, Pazo de Lóngora, Liáns, Oleiros E-15179, A Coruña, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 November 2012

Received in revised form 15 January 2013

Accepted 15 January 2013

Available online 23 January 2013

Keywords:

Alkylphenols

Nonylphenol

Membrane assisted solvent extraction

LC-ESI-MS/MS

Water samples

Water Framework Directive

ABSTRACT

This work describes the development and validation of a novel, simple, sensitive and environmental friendly analytical method for the determination of alkylphenols in different types of water samples. The methodology was based on a membrane assisted solvent extraction of only 15 mL of water sample with 500 μ L of hexane in combination with liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry in negative mode (LC-ESI-MS/MS). Acquisition was performed in the multiple reaction monitoring (MRM) mode recording two transitions for the identification of the target compounds. Quantitation is based on the use of deuterated labelled standards as surrogate standards. The figures of merit were satisfactory in all cases: absolute recoveries were close to 50% for most investigated compounds and relative recoveries varied between 81 and 108%. Repeatability and intermediate precision were <20% for all compounds. Uncertainty assessment of measurement was estimated on the basis of an in-house validation according to EURACHEM/CITAC guide. Quantitation limits of the method (MQL) were lower than 0.04 μ g L⁻¹ in all cases, which allow the achievement of the limits established by the Directive 2008/105/EC for surface and seawater samples and by the new proposal COM (2011) 876 final. The feasibility of the proposed method was demonstrated analyzing seawater, surface water and drinking water samples from different areas of A Coruña (Northwest of Spain). The analyses evidenced the presence of nonylphenol in seawater (MQL-0.13 μ g L⁻¹) and surface water samples (0.12–0.19 μ g L⁻¹). The highest concentration was observed in drinking water (0.25 μ g L⁻¹).

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Alkylphenols (APs) are considered estrogenic endocrine-disrupting compounds which could have negative effect in human reproduction at low concentrations, acting on the estrogens receptors [1]. These compounds are constituents of household and industrial products as herbicides, detergents and plasticizers. Furthermore, octyl- and nonylphenol are used in the production of their derivatives ethoxylates (alkylphenol ethoxylates), one of the main non-ionic surfactants [2].

Due to their wide use and their hazardous properties, alkylphenols were listed as priority substances in the field of water policy by Water Framework Directive 2000/60/EC [3] and Directive 2008/105/EC [4] which establishes Environmental Quality Standards (EQS) for these compounds. The annual average (AA)

for 4-nonylphenol in seawater and surface waters is 0.3 μ g L⁻¹, whereas the maximum allowable concentration (MAC) is 2 μ g L⁻¹. In the case of 4-*tert*-octylphenol, the AA is 0.01 μ g L⁻¹ in seawater and 0.1 μ g L⁻¹ in surface water. However, the MAC is not applicable since the AA values are lower than the values derived on the basis on acute toxicity. Recently, a new proposal for water legislation COM (2011) 876 final [5] has been published and maintain the same EQS for these compounds. No limits for APs in drinking water have been established yet; however, the analysis of these analytes in this kind of water is mandatory in order to protect human health.

Several techniques have been used to analyze alkylphenols. In the last years, gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) has been widely employed in environmental analysis of these compounds. Two ISO standard methods for the analysis of alkylphenols in water sample are based on liquid-liquid extraction (LLE) [6] and solid-phase extraction (SPE) [7] coupled with GC-MS. Other proposed extraction techniques in combination with GC-MS were liquid-phase microextraction [8], microextraction by packed sorbents (MEPS) [9] or stir bar microextraction (SBSE) [10,11].

* Corresponding author. Tel.: +34 981 167000; fax: +34 981 167065.
E-mail address: smuniat@udc.es (S. Muniategui-Lorenzo).

Nevertheless, the presence of polar groups complicates the analysis of alkylphenols by GC-MS. Thus, an additional derivatization step could be required to obtain symmetric chromatographic peaks and good precision [12]. A more convenient alternative, which avoids losses of analytes and simplifies the experimental procedure is liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) [13]. Novel LC-MS/MS interfaces such as electrospray (ESI) and atmospheric pressure chemical ionization (APCI) were employed in analysis of alkylphenols [14]. Better results were obtained with ESI due to its high sensitivity; although ESI is commonly affected by co-eluting matrix compounds, this problem could be corrected with the use of internal standard [15].

Solid phase extraction is commonly used combined with LC-MS/MS in order to remove possible interferences and pre-concentrate the analytes [16,17]. Classical extraction techniques are required time-, solvent- and labour-consuming. Nowadays, newer, solvent-free and solvent-reduced techniques were employed, according with the principles of the Green Chemistry [18]. Analysis of alkylphenols by microextraction techniques such as single-drop microextraction (SDME) [19], dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) [20], hollow fibre-protected liquid phase microextraction [21] or microporous membrane liquid-liquid extraction [22] can be found in the literature.

Other alternative technique, based on the use of membranes, is membrane-assisted solvent extraction (MASE). The principle of MASE, described at first by Hauser et al. [23] in 2001, is based on the diffusion of organic compounds dissolved in an aqueous sample through a membrane bag into a small amount of organic solvent [24]. Hydrophobic porous or non-porous polymeric membranes are the most common devices used in MASE applications. Although porous membranes can be employed as a filter, non-porous membranes are not only considered as a barrier for particles, macromolecules and polar species; they can also provide selectivity and specificity in terms of permeation and transport through the membrane [25].

This technique was applied to the analysis of UV filters [25], volatile organic compounds [26], polycyclic aromatic hydrocarbons [27], polycyclic musk compounds [28], pesticides [29,30], phosphoric acid triesters [31], polychlorinated biphenyls [24,32] triazines and organochlorine compounds [33,34]. Recently, endocrine disrupting compounds were also analyzed by MASE [35], however, the determination was carried out by GC-MS. To the best of our knowledge, no previous work specifically focused on the analysis of alkylphenols in waters by MASE-LC-MS/MS can be found in the literature.

The main novelty of this work is the development and validation of a novel, simple, fast and sensitive miniaturized method for the determination of APs in water samples based on membrane-assisted solvent extraction followed by the quantification using LC-ESI-MS/MS. According with the principles of the Green Chemistry, small volume of organic solvents (500 μ L) was employed. The low method quantitation limits (MQL) obtained enables the determination of alkylphenols at ultratrace levels according to the restrictive legislation (Directive 2008/105/EC) analyzing only 15 mL of sample. Furthermore, these MQLs were lower than 30% of EQS in compliance with the requirements set by Directive 2009/90/EC [36]. The small volume of sample required facilitates the sampling, transport, manipulation and storage of the samples; consequently, this method could be an important tool in monitoring programmes to control the fate and occurrence of alkylphenols in the environment.

2. Experimental

2.1. Standards and reagents

Nonylphenol technical mixture (NP) 94% purity ($\pm 1\%$ tolerance) and 4-n-nonylphenol (4-n-NP) 99.9% purity ($\pm 0.5\%$ tolerance) were from Riedel-de Haën (Seelze, Germany). 4-tert-octylphenol (4-tOP) 97% purity ($\pm 0.5\%$ tolerance) and 4-octylphenol (4-OP) 99% purity ($\pm 0.5\%$ tolerance) were obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). All standard solutions (1000, 10 and 1 mg L⁻¹) containing all the target compounds were prepared in methanol (SPS grade) from Romil Ltd (Cambridge, United Kingdom) and stored at 4 °C.

As surrogate internal standard, 4-n-nonylphenol-2,3,5,6-d₄ (4-n-NP-d₄) 99.3% was obtained from CDN Isotopes (Pointe-Claire, Canada).

For the extraction procedure, n-Hexane for organic trace analysis (UniSolv®) was from Merck (Darmstadt, Germany) and methanol (SPS grade) from Romil Ltd (Cambridge, United Kingdom).

For the determination, methanol LC-MS PAI and ammonia (30%) for instrumental analysis were from Panreac (Barcelona, Spain). Water was purified with a Direct 5 Milli Q system (Millipore, Bedford, MA, USA). Seawater, surface water and drinking water were used for the optimization and validation of the proposed method.

2.2. Sampling

Water samples were collected in the metropolitan area of A Coruña (Galicia, NW Spain), which comprises a population of ca. 420,000 inhabitants. Surface water samples were collected along the Mero river basin, at four different points. Seawater samples were collected in eight beaches situated close to urban and industrial zones. Drinking water samples were collected in six private houses distributed in different zones of the studied metropolitan area, the same day and at same hour approximately. In this area, river water (supplied from Cecebre dump) was treated by sand filtration, coagulation/flocculation and chlorination in a drinking water treatment plant (DWTP) for human consumption. The sampling locations are shown in Fig. 1.

All samples were collected in amber glass 1 L bottles (pre-cleaned with acetone and methanol and rinsed with each water samples) and stored at 4 °C before the analysis. No modifier was added to the samples in order not to affect the extraction process. To avoid the adsorption of alkylphenols to the glassware, water samples should be analyzed before 5 days when no modifier was added [37].

2.3. Extraction

The MASE device commercially available by Gerstel (Mülheim, Germany) consists of a 20 mL glass vial with a membrane insert made of dense polypropylene (4-cm long with a wall thickness of a 0.03 mm and an internal diameter of 6 mm). This synthetic solid polymer has a good stiffness and stays stable during the possible highest agitation speed.

The membrane bag is fixed to a metal funnel (using a Teflon ring) suspended in the opening of the glass vial. Finally, the vial is sealed with a metallic crimp cap. Membrane bags should be cleaned and preconditioned with the extraction solvent before the extraction.

In the optimized extraction procedure, 15 mL of water samples were placed in the 20 mL vial. The membrane bag was filled with 500 μ L of hexane, which is used as extractant solvent. Then, the vial was vigorously shaken at room temperature using an agitation plate Vibrax-VXR by IKA (Staufen, Germany) during 60 min at

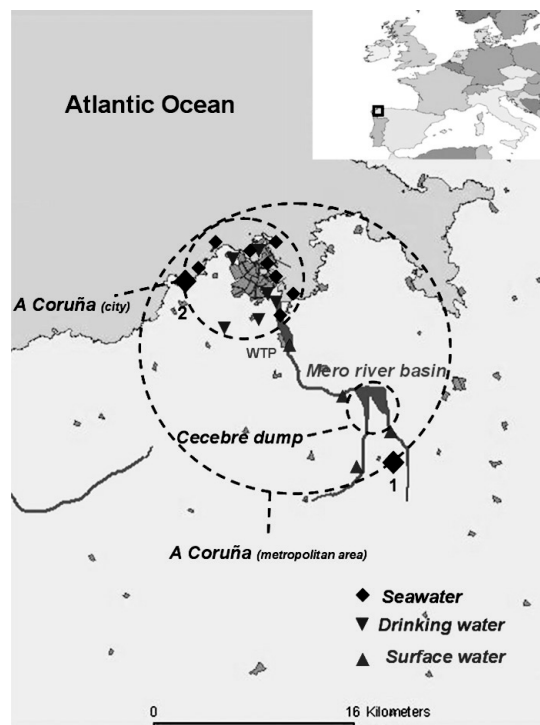


Fig. 1. Map of the sampling area.

750 rpm. After extraction, the organic solvent was manually collected and transferred into a 2 mL amber sampler vial.

The extracts were evaporated to dryness under nitrogen stream and reconstituted in 200 μ L of methanol. A scheme of the extraction procedure is shown in Fig. 2.

2.4. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry

LC-MS/MS analyses were performed using an Agilent HP-1200 Series LC system equipped with an autosampler (volume injected was 25 μ L), a binary solvent pump and a thermostated column oven coupled to a mass spectrometer with a triple quadrupole detector (API 3200, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). It was equipped with an APCI/ESI source.

The chromatographic separation was carried out with a column Hypersil Gold C18 (150 \times 2.1 mm), 3 μ m Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA), using as mobile phase A (water) and B (methanol) with 0.05% of ammonia as an eluant modifier. A 14 min gradient was performed as follows: 20% B (1 min) to 100% B in 4 min; this percentage was maintained for 7 min and returned to initial conditions in 2 min. The system was re-equilibrated for 7 min between runs. The flow rate was 0.25 ml min⁻¹ and the oven temperature was set at 40 °C.

All compounds were detected with ESI interface operating in negative mode. The MS/MS conditions were previously described [20].

2.5. Quantitation and quality control

According to the Decision 2002/657/EC, four identification points (one precursor ion and two products ions) were required for

a suitable confirmation of the compounds for LC-MS/MS analysis [38]. Thus, two multiple-reaction monitoring (MRM) were chosen for the identification and quantitation of each compound, except in the case of 4-OP [20]. Moreover, the relation between the MRM transitions (MRM ratio) was also used as a criterion for the identification in samples analysis. These parameters are shown in Table 1.

For the quantitation, deuterated surrogate standard (4-n-NP-d₄) was added to the water samples before the extraction in order to correct matrix effect and to compensate possible losses of analytes during the experimental procedure.

Blank contamination is a well-known problem in the ultratrace analysis of alkylphenols. As it was said in previous studies, the use of detergents and plastic material should be avoided. Moreover, all the glassware was carefully washed with acetone, Milli-Q water and methanol before use [37]. Blank analysis revealed the presence of NP at concentration below limit of detection. Consequently, procedural blank were checked in each batch and kept under control. The contribution of NP was subtracted from the samples in order to avoid overestimations in the results.

3. Results and discussion

3.1. Optimization of MASE extraction parameters

The optimization of the MASE procedure was carried out using seawater samples. Then, the applicability of the optimized methodology for the analysis of other types of waters (surface and drinking water samples) was tested in order to consider possible changes in the experimental procedure, taking into account matrix effects.

The main parameters which affect the extraction such as extraction solvent, temperature and extraction time were studied. Other parameters were selected according to previous reported works. For improving the transport of the analytes to the membrane, the vials were shaken in the agitator at 750 rpm [24]. Similar extraction efficiencies were found for different volumes of organic solvent [27]; consequently, a small volume (500 μ L) was selected in order to reduce the consumption of solvent. No pH adjustment was considered in order to maintain the compounds in the neutral form. Finally, the addition of salt was not considered taking into account that the optimization of the method was carried out using seawater samples. In any case, salt effect seems only effective for very polar compounds and could reduce the extraction yields of non polar analytes (log K_{ow} > 4) [34].

3.1.1. Preconditioning and clean up of the membrane bags

Membrane bags should be cleaned and preconditioned before the extraction in order to remove interfering compounds like alkanes and phthalates which could be co-extracted from the membrane material.

For carrying out this step, 8–10 membrane bags were attached to 50 mL glass tube and extracted with 10 mL of hexane at room temperature for 1 h at 75 rpm. After that, the solvent was exchanged and the extraction was repeated and left overnight.

3.1.2. Selection of extraction solvent

Some organic solvents (500 μ L) with different water miscibility and polarity –ethyl acetate (AcOEt), 1, 2-dichlorometane (DCM) and n-hexane– were tested to be an optimal extractant solvent. More polar solvents such as methanol, ethanol or acetonitrile were discarded in order to avoid losses of the target analytes. Due to their water miscibility, these solvents can diffuse through the membrane to the aqueous phase. Consequently, the final volume of organic solvent after agitation can vary affecting to the reproducibility of the results [24].

In the first assay, 15 mL of seawater spiked at a 1 μ g L⁻¹ level of all the target compounds ($n=3$) were extracted with 500 μ L of

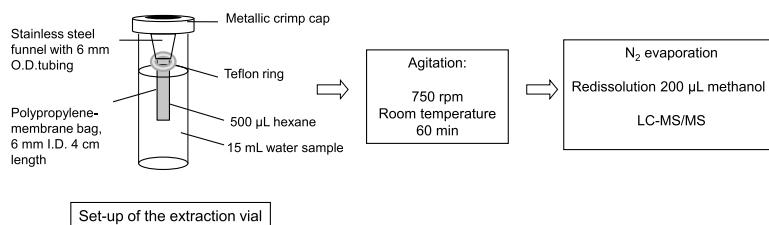


Fig. 2. A scheme of miniaturized MASE system.

Table 1

Structure, octanol-water partition coefficients (K_{ow}), water solubility and MS/MS parameters for each compound and for the surrogate standard (SS).

Analyte	Structure	$\log K_{ow}$	Water solubility at 25 °C (mg L ⁻¹)	MS transitions ^a	MRM Ratio ^c
4-tOP		5.28	19.00	205(45), 133 ^b (30) 205 (45), 116 (76)	8.9 ± 0.3
NP		5.76	5.43	229 (40), 133 ^b (38) 229 (40), 116 (74)	5.8 ± 0.1
4-OP		5.56	12.60	205 (50), 106 ^b (26) —	—
4-n-NP		5.99	4.90	219 (45), 106 ^b (28) 219 (45), 119 (44)	22.4 ± 0.4
4-n-NP-d ₄ (SS)		5.76	—	223 (45), 109 ^b (28) 223 (45), 129 (46)	14.4 ± 1.1

^a Precursor ion (declustering potential, V), fragment ions (collision energy, V).^b Quantitation ion.^c Ratio and tolerances between quantification and confirmation MRM transitions according to Decision 2002/657/EC.

each solvent mentioned above. The 20-mL glass vials were shaken at 750 rpm during 40 min at 40 °C.

As can be seen in Fig. 3, lower recoveries for 4-tOP and NP were obtained when ethyl acetate is used as extractant solvent. Satisfactory recoveries (>80% for all compounds) were observed with DCM and n-hexane. However, RSD > 20% were shown when DCM

was employed. For these reasons, hexane was chosen as extraction solvent.

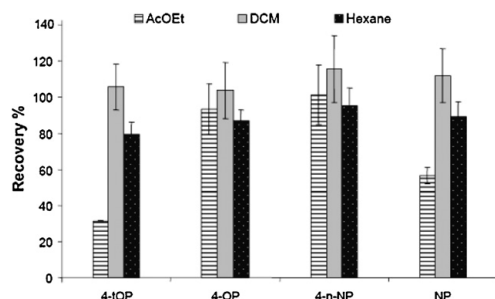
3.1.3. Optimization of extraction temperature

Another studied parameter was the extraction temperature. Vaporization of solvent can occur when temperatures closed to the boiling point (69 °C for hexane) are employed. For this reason, lower temperatures were tested. A comparison between room temperature (20 °C) and 40 °C was done ($n = 3$). The rest of extraction conditions were previously described (500 µL of hexane as extraction solvent and agitation at 750 rpm during 40 min).

As observed in Fig. 4, the same results were obtained for 4-OP and 4-n-NP. However, higher recoveries were shown for the rest of compounds at room temperature. In order to improve the obtained results (recoveries ~100%) and to simplify the experimental procedure, the extraction was carried out a room temperature.

3.1.4. Optimization of extraction time

Finally, the extraction time was also studied. In the same conditions, different extraction time varied between 40 and 120 min were tested ($n = 3$). As it can be seen in Fig. 5, an increase of the extraction yield was observed from 40 to 60 min. No significant variation between 60 and 90 min were found. After 90 min, higher

Fig. 3. Selection of extraction solvent in MASE ($n = 3$).

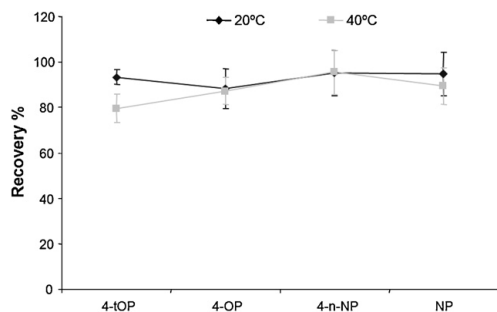


Fig. 4. Effect of temperature in MASE ($n = 3$).

recoveries ($> 120\%$) and higher RSD $> 20\%$ were observed. This fact can be explained considering the possible co-extracted matrix compounds co-elute with the analytes and may interfere with ionization. In order to decrease the total analysis time, 60 min was chosen.

3.2. Matrix effect

MASE is an equilibrium extraction technique; therefore, competitive adsorption to matrix components can reduce the quantity of analyte transferred into organic phase [27]. Moreover, ion suppression and enhancement originating from matrix components is common in electrospray ionization (ESI) [15]. For these reasons, this phenomenon should be evaluated.

In this study, matrix effect was evaluated by investigating the applicability of the proposed method to determine APs in other water samples. In this context, the optimized approach was applied to the analysis of surface and drinking water.

A volume of 15 mL of each water sample was spiked at $1 \mu\text{g L}^{-1}$ level of the target compounds and extracted with 500 μL of hexane at room temperature and 750 rpm during 60 min. The analyte response was compared to the response of a standard solution of the same concentration. Recoveries between 85 and 104% were obtained in the analysis of all samples. These results show a slight matrix effect ($< 20\%$) which can be attributed to the separation of the aqueous sample and organic solvent by the non-porous membrane [31].

On the other hand, the use of chlorination as water renovation and disinfection should be taken into account in the analysis of drinking water. Some authors proved the influence of free chlorine in the analysis of some compounds such as polycyclic aromatic

hydrocarbons [39]. In order to avoid this fact, EPA recommended the addition of sodium thiosulfate (80 mg L^{-1}) to the sample prior to analysis [40].

In order to study the influence of free chlorine in the analysis of alkylphenols, a drinking water sample (with and without sodium thiosulfate) was spiked at $1 \mu\text{g L}^{-1}$ and analyzed in the conditions previously mentioned. Recoveries between 85 and 99% were obtained in both cases. Consequently, no influence of free chlorine was observed and the addition of sodium thiosulfate is unnecessary in this analysis.

3.3. Method validation

The analytical methodology was validated in terms of linearity, accuracy, precision, sensitivity and selectivity for each kind of water. Due to the fact that certificated reference materials of these compounds in water are not available, the figures of merit of the method were evaluated analyzing spiked seawater, surface and drinking water samples. All these parameters obtained for each compound in the different type of water are shown in Table 2.

Linearity ($r > 0.9975$) was evaluated between 0.01 and $20 \mu\text{g L}^{-1}$ using seven calibration points ($n = 2$). The response was linear between the MQL and 5 and/or $10 \mu\text{g L}^{-1}$. Furthermore, the enrichment factors (EF) were calculated [41] and ranged from 15 to 75 for all compounds, analysing only 15 mL of water samples.

Precision and accuracy for each compound were determined at different concentrations levels distributed over the linear range: low, medium and high concentration (0.05 , 0.25 and $1.25 \mu\text{g L}^{-1}$ in water samples). To evaluate the accuracy the analytical recoveries of spiked samples were calculated. As it was explained before, the presence of NP in procedural blank was taken into account and the contribution of NP blank ($0.0005 \mu\text{g L}^{-1}$) was subtracted from the spiked samples. Mean recoveries ($n = 7$) ranged from 81 to 108% for all concentrations, all compounds and all types of water samples.

The repeatability was calculated as within-day RSD of concentrations, using seven replicates of spiking seawater samples analyzed with the proposed method during the same day and the same analyst and equipment. For intermediate precision, ten replicates of spiked seawater analyzed with the proposed method during different days along two weeks and the same analyst and equipment. In all cases, the repeatability and the intermediate precision of the method were satisfactory, with RSD $< 15\%$ and 20% respectively.

Uncertainty of the analytical method was also estimated on the basis of in-house validation data according to EURACHEM/CITAC guide [42] for all compounds at three spiking levels for each kind of water. The main sources of uncertainty were identified and quantified and combined uncertainty (u_c) was calculated as it was described in a previous work [20]. The combined uncertainties obtained for each compound, concentration and type of water samples were shown also in Table 2. The relative uncertainties were lower than 25% in all cases.

The method detection limit (MDL) and method quantitation limit (MQL) were estimated as $X_b + 3SD_b$ (X_b : average and SD_b : standard deviation of the seven blank samples) and $X_b + 10SD_b$, respectively. The obtained MDLs and MQLs are shown in Table 3.

In the case of seawater and surface water, the MQLs of the proposed method allow the determination of octyl- and nonylphenols at the levels established by the legislation in surface and seawater samples (Directive 2008/105/EC and new proposal COM (2011) 876 final). Moreover, these MQLs are lower than the 30% of the environmental quality standards requested by the Directive 2009/90/EC [36]. For drinking water analysis, MQLs ranged between 0.02 and $0.04 \mu\text{g L}^{-1}$ were obtained.

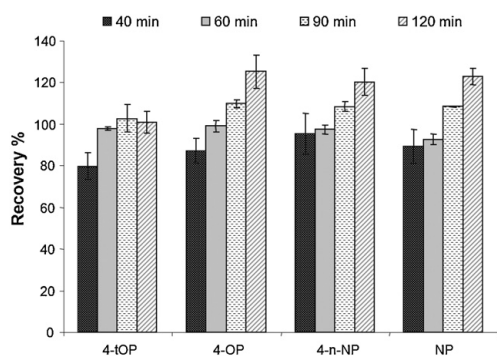


Fig. 5. Effect of DLLME extraction time ($n = 3$).

Table 2

Quality control parameters of the analytical method: linear range ($\mu\text{g L}^{-1}$), linear determination coefficients (r^2), absolute recoveries and relative recoveries (%), repeatability and intermediate precision (RSD%) and uncertainty in different types of water samples analyzed by MASE-LC-MS/MS.

Type of Water Samples	Analyte	Linearity (r^2)	Concentration in sample \pm Uncertainty ^a ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Accuracy (%)		Precision (%)	
				Absolute recovery (n = 7)	Relative recovery (n = 7)	Repeatability (n = 7)	Intermediate precision (n = 10)
Seawater	4-t-OP	MQL-5 (0.9992)	0.05 \pm 0.013	44	108	9	20
			0.25 \pm 0.056	46	99	6	7
			1.25 \pm 0.26	41	94	9	8
	4-OP	MQL-10 (1)	0.05 \pm 0.011	46	91	6	12
			0.25 \pm 0.050	48	98	3	3
			1.25 \pm 0.25	48	101	6	6
	4-n-NP	MQL-5 (0.9992)	0.05 \pm 0.011	43	81	10	15
			0.25 \pm 0.052	48	90	11	12
			1.25 \pm 0.26	47	98	10	8
	NP	MQL-10 (0.9999)	0.05 \pm 0.010	66	101	8	11
			0.25 \pm 0.056	41	85	14	19
			1.25 \pm 0.28	42	82	4	14
Surface water	4-t-OP	MQL-5 (0.9975)	0.05 \pm 0.011	46	93	10	14
			0.25 \pm 0.071	42	102	5	13
			1.25 \pm 0.26	50	103	4	12
	4-OP	MQL-5 (0.9993)	5 \pm 0.011	49	98	15	15
			0.25 \pm 0.068	46	104	3	5
			1.25 \pm 0.25	50	95	5	12
	4-n-NP	MQL-10 (0.9997)	0.05 \pm 0.011	46	87	7	13
			0.25 \pm 0.065	44	94	5	5
			1.25 \pm 0.25	54	97	3	3
	NP	MQL-10 (0.9998)	0.05 \pm 0.011	50	90	15	13
			0.25 \pm 0.068	42	89	3	10
			1.25 \pm 0.26	48	91	5	7
Drinking water	4-t-OP	MQL-10 (0.9991)	0.05 \pm 0.011	40	87	8	13
			0.25 \pm 0.052	47	87	11	12
			1.25 \pm 0.27	40	87	13	14
	4-OP	MQL-5 (0.9994)	0.05 \pm 0.011	41	90	9	9
			0.25 \pm 0.052	50	96	13	14
			1.25 \pm 0.25	46	95	8	8
	4-n-NP	MQL-10 (0.9981)	0.05 \pm 0.011	41	95	13	13
			0.25 \pm 0.051	49	94	9	10
			1.25 \pm 0.25	46	95	5	6
	NP	MQL-10 (0.9995)	0.05 \pm 0.011	40	101	16	16
			0.25 \pm 0.053	50	85	10	11
			1.25 \pm 0.27	40	86	9	10

^aExpanded uncertainty (U) with coverage factor 2 (95% of confidence).

3.4. Comparison with other reported methods

Several analytical methodologies are focused on the analysis of alkylphenols in a particular type of water such as surface and wastewater samples. However, the proposed methodology was validated for the analysis of three types of waters, including seawater and drinking water which were slightly studied.

This method is simple, no labour-consuming and free solvent, which are advantages in comparison with other techniques such as SPE or LLE [7,8,16]. Low cost is another important point; membrane bags can be reused after a simple cleaning procedure until seven-fold extraction [24]. Furthermore, recovery yields and relative

standard deviations were comparable with other microextraction techniques [21,43].

Sampling, transport and storage of the samples were easier than in other reported methodologies because of the low volume of sample required (15 mL). Moreover, due to the enrichment of the analytes in the organic phase, low method quantitation limits could be obtained and the EQS set by Directive 2008/105/EC and by the new proposal COM (2011) 876 final could be achieved. These MQLs were smaller than the levels obtained in our previous work when DLLME was applied [20] and reported by other authors [16,19,20] and similar to the levels obtained in other works [44–46], where a higher volume of sample was used (>500 mL).

Table 3

Method detection limits (MDL) and method quantitation limits (MQL) calculated and experimentally verified, precision (RSD%) and recoveries (R%) obtained. Directive 2008/105/EC and proposal COM (2011) 876 final requirements for each compound.

Compound	Seawater				Surface water				Drinking water	
	Experimental limits ($\mu\text{g L}^{-1}$)		Directive values ($\mu\text{g L}^{-1}$)		Experimental limits ($\mu\text{g L}^{-1}$)		Directive values ($\mu\text{g L}^{-1}$)		Experimental limits ($\mu\text{g L}^{-1}$)	
	MDL	MQL	AA	MAC	MDL	MQL	AA	MAC	MDL	MQL
4-t-OP	0.003	0.007	0.01	N.a	0.002	0.005	0.1	N.a	0.008	0.02
4-OP	0.0005	0.001	0.01	N.a	0.0006	0.0015	0.1	N.a	0.008	0.02
4-n-NP	0.001	0.003	0.3	2	0.0007	0.002	0.3	2	0.016	0.04
NP	0.003	0.012	0.3	2	0.011	0.032	0.3	2	0.015	0.04

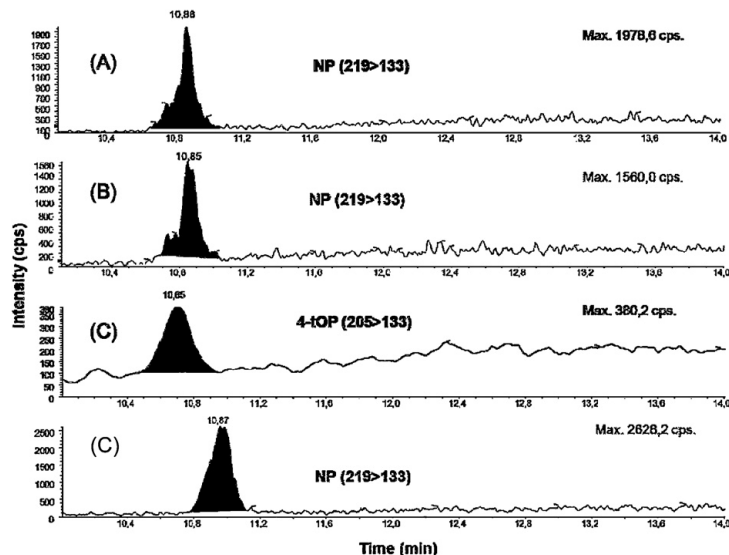


Fig. 6. LC-MS/MS chromatogram of some positive analyzed samples considered in Table 4: (A) Drinking water (D-03) (B) Surface water (SF-01) and (C) Seawater (S-01).

3.5. Analysis of water samples

In order to demonstrate the feasibility and applicability of the proposed MASE-LC-MS/MS method some seawater, surface and drinking water samples obtained from different zones of the metropolitan area of A Coruña (NW Spain) were analyzed. Sampling points were chosen to study the presence of alkylphenols in the water cycle of this area. Chromatograms of seawater, surface and drinking waters were shown in Fig. 6.

These compounds were found at concentrations showed in Table 4. Expectedly, 4-OP and 4-n-NP were not found in any sample due to the fact that these compounds are not used in industrial applications.

In surface water samples, nonylphenol was detected in all samples at concentrations between 0.12 and 0.19 $\mu\text{g L}^{-1}$. These levels of

NP are lower than the EQS established in the Directive 2008/105/EC for surface waters (AA of 0.3 $\mu\text{g L}^{-1}$ and MAC of 2 $\mu\text{g L}^{-1}$). On the other hand, these concentrations are similar to other published results measured in Chesapeake Bay (Baltimore, MD) [46]; ten times higher than levels in Ter river (Spain) [16] or Sri Lanka [47] and lower than concentrations found in Belgian and Italy, which are near to a wastewater treatment plant [48].

In seawater samples, 4-tOP was only found in one sample (S-01) at concentration of 0.019 $\mu\text{g L}^{-1}$ which would exceed the annual average established in the Directive 2008/105/EC. Nonylphenol was detected in all the samples at concentrations ranged from <MQL to 0.16 $\mu\text{g L}^{-1}$. The concentrations obtained in this study are similar to the reported levels in other coastal zones in Spain [43] and Portugal [17] and lower than other measured in larger cities such as Singapore or Jamaica [49].

In drinking water, NPs were not detected above the MQL which showed that alkylphenols were eliminated during drinking water treatment. This compound was only measured in one sample (D-03) at concentration level of 0.25 $\mu\text{g L}^{-1}$. This concentration is higher than the levels of NP measured in surface water before the DWTP, which shows that the contamination could be originated in the water supply system, normally made of PVC and other plastics. The obtained concentrations are similar to the levels measured in the Northern Italy [50] and lower than concentrations found in Guangzhou (China) [51].

4. Conclusions

The analytical methodology proposed in this work is the first one which allows the extraction, identification and quantitation of alkylphenols in seawater, surface and drinking water at ultratrace levels by MASE-LC-MS/MS.

The main advantages of the method are simplicity, sensitivity, easy handling and low cost. Furthermore, this technique reduces the use of solvents in agreement with the principles of the Green Chemistry.

With the proposed method, satisfactory reproducibility, accuracy and low limits of quantification were obtained. Using only

Table 4
Concentrations ($\mu\text{g L}^{-1}$) of alkylphenols in seawater (S) and surface (SF) and drinking (D) water samples collected in different areas of A Coruña (NW Spain).

Samples	4-tOP	4-OP	4-n-NP	NP
S-01	0.019	n.d ^a	n.d ^a	0.16
S-02	n.d ^a	n.d ^a	n.d ^a	0.030
S-03	n.d ^a	n.d ^a	n.d ^a	<MQL ^b
S-04	n.d ^a	n.d ^a	n.d ^a	0.13
S-05	n.d ^a	n.d ^a	n.d ^a	0.093
S-06	n.d ^a	n.d ^a	n.d ^a	0.092
S-07	<MQL ^b	n.d ^a	n.d ^a	0.081
S-08	n.d ^a	n.d ^a	n.d ^a	0.11
SF-01	n.d ^a	n.d ^a	n.d ^a	0.19
SF-02	n.d ^a	n.d ^a	n.d ^a	0.12
SF-03	n.d ^a	n.d ^a	n.d ^a	0.15
SF-04	n.d ^a	n.d ^a	n.d ^a	0.12
D-01	n.d ^a	n.d ^a	n.d ^a	<MQL ^b
D-02	n.d ^a	n.d ^a	n.d ^a	<MQL ^b
D-03	n.d ^a	n.d ^a	n.d ^a	0.25
D-04	n.d ^a	n.d ^a	n.d ^a	<MQL ^b
D-05	n.d ^a	n.d ^a	n.d ^a	<MQL ^b
D-06	n.d ^a	n.d ^a	n.d ^a	<MQL ^b

^a Not detected.

^b Below method quantitation limit.

15 mL of sample (which facilitates sampling, transport and storage) ultratrace levels of alkylphenols can be determined allowing the compliance of the Directive 2008/105/EC and the new proposal COM (2011) 876 final and of the requirements set by Directive 2009/90/EC.

The application of this methodology to the analysis of seawater, surface and drinking water samples proved its practicability. The presence of NP in all samples demonstrated the ubiquity of this compound.

For all these reasons, this methodology could be a simple, reliable and economical tool for monitoring programmes to control the fate and occurrence of alkylphenols in the environment.

Acknowledgements

This work has been financially supported by Xunta de Galicia (Ref: 09MDS038103-PR) and “Program of Consolidation and structuring of competitive research groups in the University system of Galicia” (Ref 52/2010)-Xunta de Galicia. N. Salgueiro-González acknowledges Xunta de Galicia and Campus do Mar International Campus of Excellence for Ph.D. grant and G. Fernández-Martínez (SAI-UDC) by the LC-MS/MS support.

References

- [1] M. Petrovic, M. Sole, M.J.L. de Alda, D. Barcelo, *Environ. Toxicol. Chem.* 21 (2002) 2146.
- [2] P. Navarro, J. Bustamante, A. Vallejo, A. Prieto, A. Usobiaga, S. Arrasate, E. Anakabe, E. Puy-Azurmendí, O. Zuloaga, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 5890.
- [3] Directive 2000/60/EC, Establishment and Framework for Community Action in the Field of Water Policy, European Parliament and the Council of the European Union, 2000.
- [4] Directive 2008/105/EC, Environmental Quality Standards in the Field of Water Policy, Amending and Subsequently Repealing Council Directives 82/176/EEC, 83/513/EEC, 84/156/EEC, 84/491/EEC, 86/280/EEC and Amending Directive 2000/60/EC, European Parliament and the Council of the European Union, 2008.
- [5] COM. (2011) 876 final, Proposal for a Directive of the European Parliament and of the Council amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy, 2011.
- [6] International Standard Organization, ISO/CD 18857-2. Water quality: Determination of selected alkylphenols. Part2: Gas chromatographic-mass spectrometric determination of alkylphenols, their ethoxylates and bisphenol A in non-filteres samples following solid-phase extraction and derivatisation, 2009.
- [7] International Standard Organization ISO/CD 18857-1. Water quality: Determination of selected alkylphenols. Part 1. Method for non-filteres samples using liquid–liquid extraction and gas chromatography with mass selective detection, 2005.
- [8] Y.C. Fiamegos, C.D. Stalikas, *Anal. Chim. Acta* **597**, 2007, 32.
- [9] A. Prieto, S. Schrader, M. Moeder, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 6002.
- [10] M. Kawaguchi, K. Inoue, M. Yoshimura, R. Ito, N. Sakui, H. Nakazawa, *Anal. Chim. Acta* 505 (2004) 217.
- [11] S. Nakamura, S. Daishima, *J. Chromatogr. A* 1038 (2004) 291.
- [12] G. Gatidou, N.S. Thomaidis, A.S. Stasinakis, T.D. Lekkas, *J. Chromatogr. A* 1138 (2007) 32.
- [13] L. Brossa, E. Pocurull, F. Borrull, R.M. Marce, *Chromatographia* 59 (2004) 419.
- [14] H. Gallart-Ayala, E. Moyano, M.T. Galceran, *Mass Spectrom. Rev.* 29 (2010) 776.
- [15] T. Benijts, R. Dams, W. Lambert, A. De Leenheer, *J. Chromatogr. A* 1029 (2004) 153.
- [16] R. Cespedes, S. Lacorte, A. Ginebreda, D. Barcelo, *Environ. Pollut.* 153 (2008) 384.
- [17] N. Jonkers, A. Sousa, S. Galante-Oliveira, C. Barroso, H. Kohler, W. Giger, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 17 (2010) 834.
- [18] P.T. Anastas, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 29 (1999) 167.
- [19] J. López-Darias, M. Germán-Hernández, V. Pino, A.M. Afonso, *Talanta* 80 (2010) 1611.
- [20] N. Salgueiro-González, E. Concha-Graña, I. Turnes-Carou, S. Muniategui-Lorenzo, P. López-Mahía, D. Prada-Rodríguez, *J. Chromatogr. A* 1223 (2012) 1.
- [21] C. Basheer, H.K. Lee, *J. Chromatogr. A* 1057 (2004) 163.
- [22] J.F. Liu, X. Liang, G.B. Jiang, Y.Q. Cail, Q.X. Zhou, G.G. Liu, *J. Sep. Sci.* 26 (2003) 823.
- [23] B. Hauser, P. Popp, *J. Sep. Sci.* 24 (2001) 551.
- [24] M. Schellin, P. Popp, *J. Chromatogr. A* 1020 (2003) 153.
- [25] R. Rodil, S. Schrader, M. Moeder, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 4887.
- [26] M. Schellin, P. Popp, *J. Chromatogr. A* 1103 (2006) 211.
- [27] R. Rodil, M. Schellin, P. Popp, *J. Chromatogr. A* 1163 (2007) 288.
- [28] T. Einsle, H. Paschke, K. Bruns, S. Schrader, P. Popp, M. Moeder, *J. Chromatogr. A* 1124 (2006) 196.
- [29] M. Schellin, B. Hauser, P. Popp, *J. Chromatogr. A* 1040 (2004) 251.
- [30] M. Moeder, C. Bauer, P. Popp, M. van Pinxteren, T. Reemtsma, *Anal. Bioanal. Chem.* 403 (2012) 1731.
- [31] J.B. Quintana, T. Reemtsma, *J. Chromatogr. A* 1124 (2006) 22.
- [32] T. Barri, S. Bergstrom, J. Norberg, J.A. Jonsson, *Anal. Chem.* 76 (2004) 1928.
- [33] C. Vincelet, D. Benanou, J.M. Roussel, *Am. Lab.* 40 (2008) 14.
- [34] B. Hauser, M. Schellin, P. Popp, *Anal. Chem.* 76 (2004) 6029.
- [35] A. Iparraguirre, P. Navarro, A. Prieto, R. Rodil, M. Olivares, L.-A. Fernandez, O. Zuloaga, *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012) 2897.
- [36] Commission Directive 2009/90/EC, Technical Specifications for Chemical Analysis and Monitoring of Water Status, European Parliament and the Council of the European Union, 2009.
- [37] E.C.-G.N. Salgueiro-Gonzalez, I. Turnes-Carou, S. Muniategui-Lorenzo, P. Lopez-Mahia, D. Prada-Rodríguez, *Talanta* 101 (2012) 413.
- [38] Commission Decision 2002/657/EC, Implementing Council Directive 96/23/EC Concerning the Performance of Analytical Methods and the Interpretation of Results, 2002.
- [39] V. Fernandez-Gonzalez, E. Concha-Grana, S. Muniategui-Lorenzo, P. Lopez-Mahia, D. Prada-Rodríguez, *J. Chromatogr. A* 1176 (2007) 48.
- [40] Environmental Protection Agency, EPA-550, Determination of Polycyclic aromatic hydrocarbons in drinking water by liquid–liquid extraction and HPLC with coupled ultraviolet and fluorescence detection, 1990. EPA-550, (1990).
- [41] C. Basheer, R. Balasubramanian, H.K. Lee, *J. Chromatogr. A* 1016 (2003) 11.
- [42] S.L.R. Ellison, M. Rosslein, A. Williams, *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurements*. EURACHEM/CITAC, 2000.
- [43] J. Sánchez-Avila, M. Fernandez-Sanjuan, J. Vicente, S. Lacorte, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 6799.
- [44] E. Martínez, O. Gans, H. Weber, S. Scharf, *Water Sci. Technol.* 50 (2004) 157.
- [45] T. Benijts, W. Lambert, A. De Leenheer, *Anal. Chem.* 76 (2004) 704.
- [46] J.E. Loyo-Rosales, I. Schmitz-Afonso, C.P. Rice, A. Torrents, *Anal. Chem.* 75 (2003) 4811.
- [47] K. Guruge, Y. Horii, N. Yamashita, *Mar. Pollut. Bull.* 62 (2011) 870.
- [48] R. Loos, G. Hanke, G. Umlauf, S.J. Eisenreich, *Chemosphere* 66 (2007) 690.
- [49] A. David, H. Fenet, E. Gomez, *Mar. Pollut. Bull.* 58 (2009) 953.
- [50] R. Loos, J. Wollgast, T. Huber, G. Hanke, *Anal. Bioanal. Chem.* 387 (2007) 1469.
- [51] X. Li, G.-G. Ying, H.-C. Su, X.-B. Yang, L. Wang, *Environ. Int.* 36 (2010) 557.

ANEXO IV

Analysis of endocrine disruptor compounds in marine sediments
by in cell clean up-presurized liquid extraction-liquid
chromatography mass spectrometry determination

Anal Chim Acta, 852 (2014) 112-120



Contents lists available at ScienceDirect

Analytica Chimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aca

Analysis of endocrine disruptor compounds in marine sediments by in cell clean up-pressurized liquid extraction-liquid chromatography tandem mass spectrometry determination



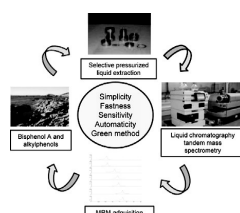
N. Salgueiro-González, I. Turnes-Carou, S. Muniategui-Lorenzo*, P. López-Mahía, D. Prada-Rodríguez

Grupo Química Analítica Aplicada (QANAP), Instituto Universitario de Medio Ambiente (IUMA), Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias, Universidade da Coruña, Campus de A Coruña, E-15071 A Coruña, Spain

HIGHLIGHTS

- Simultaneous extraction and clean-up for BPA and APs analysis in marine sediments.
- Simple, fast, sensitive and automatic analytical methodology.
- Lower volumes of solvents, analysis time and waste generation (Green Chemistry).
- Fate and occurrence of BPA and APs in marine environment.
- Sediment toxicity. Evaluation of impact in aquatic biota.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 June 2014

Received in revised form 3 September 2014

Accepted 22 September 2014

Available online 28 September 2014

Keywords:

Bisphenol A

Alkylphenols

Pressurized liquid extraction

Liquid chromatography tandem mass spectrometry

Sediment

Marine environment

ABSTRACT

A less time-, solvent- and sorbent-consuming analytical methodology for the determination of bisphenol A and alkylphenols (4-*tert*-octylphenol, 4-octylphenol, 4-*n*-nonylphenol, nonylphenol) in marine sediment was developed and validated. The method was based on selective pressurized liquid extraction (SPL) with a simultaneous in cell clean up combined with liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry in negative mode (LC-ESI-MS/MS). The SPL extraction conditions were optimized by a Plackett–Burman design followed by a central composite design. Quantitation was performed by standard addition curves in order to correct matrix effects. The analytical features of the method were satisfactory: relative recoveries varied between 94 and 100% and repeatability and intermediate precision were <6% for all compounds. Uncertainty assessment of measurement was estimated on the basis of an in-house validation according to EURACHEM/CITAC guide. Quantitation limits of the method (MQL) ranged between 0.17 (4-*n*-nonylphenol) and 4.01 ng g⁻¹ dry weight (nonylphenol). Sensitivity, selectivity, automaticity and fastness are the main advantages of this green methodology. As an application, marine sediment samples from Galicia coast (NW of Spain) were analysed. Nonylphenol and 4-*tert*-octylphenol were measured in all samples at concentrations between 20.1 and 1409 ng g⁻¹ dry weight, respectively. Sediment toxicity was estimated and no risk to aquatic biota was found.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Endocrine disruptor compounds (EDCs) have increasingly gained attention in the last years due to their potential adverse

* Corresponding author. Tel.: +34 981 167000; fax: +34 981 167065.
E-mail address: smuniat@udc.es (S. Muniategui-Lorenzo).

effects on the reproduction system of human and wildlife, as it was demonstrated in different in-vivo and in-vitro assays [1].

Among all EDCs, bisphenol A (BPA) and alkylphenols (APs) deserve special consideration due to their ubiquity in the environment. BPA is used in the production of polycarbonates, epoxy resins and flame retardants whereas APs are constituents of household and industrial products as herbicides, detergents and plasticizers [2].

The main sources of these EDCs into the environment are wastewater treatment plants discharges, where these compounds are scarcely removed [3]. Furthermore, their physical and chemical properties ($\log K_{ow}$ 3.9–4.48; K_{oc} 151–245 L kg⁻¹ [2]) suggest these compounds tend to be associated with sediments and accumulated in organisms and humans.

In order to preserve aquatic environment and public safety, chemical pollution should be considered, controlled and minimized/eliminated, as it was set in the recent Directive 2013/39/EU [4] as regards priority substances in the field of water policy amending Directive 2000/60/EC and Directive 2008/105/EC. In this way, the accumulation of pollutants in the ecosystem, the losses of habitats and biodiversity and the damage of public health will be avoided. In this Directive, Environmental Quality Standards (EQS) in waters were established for 45 priority hazardous substances. Whereas BPA was not prioritized as a possible priority substance in the new legislation, the EQS of APs showed in Directive 2008/105/EC were maintained [5]. It is known that BPA and APs are one of the major contributors of estrogenic activity in waters and sediments [6]; consequently, and in our opinion, BPA should be incorporated in future researches.

Although the fate and occurrence of BPA and APs in freshwater are widely studied, seawater is still not well-documented [7]. Marine Strategy Framework Directive (Directive 2008/56/EC) [8] establishes a community action to ensure a good environmental status of marine ecosystem, including the evaluation of contamination by hazardous substances. Therefore, monitoring programs are required to assess chemical pollution.

In general, water monitoring is used to evaluate the presence of pollutants in marine environment, comparing measured concentrations with its water EQS [9]. However, depending on the physical and chemical properties of contaminants, other matrices such as sediments or biota could also be monitored. For example, in the case of compounds with $\log K_{ow}$ between 3 and 5 such as BPA and APs, sediment is preferred as an additional monitoring matrix

[9]. However, no EQS for sediments were established at the moment by Directive 2013/39/EU due to the lack of data. For all the reasons commented before, analysis of BPA and APs in marine sediments should be encouraged.

Due to the fact that phenolic compounds tend to bind tightly to the sample matrix, an exhaustive extraction technique is needed to separate them from sediment samples. A review of the state of the art in the analytical methodologies (from 2008 to the present) for the determination of these pollutants in sediments is shown in Table 1. Classic extraction techniques such as Soxhlet extraction [10–12] and sonication [13,14] were initially employed for this purpose. However, these techniques have been replaced by others which offer a great reduction in time and solvent consumption such as pressurized liquid extraction (PLE) [15,16].

Because of the complexity of this matrix, a subsequent clean-up step is required to enable the separation and detection of these compounds at low concentrations. Off line solid phase extraction using silica gel [10,12] and Florisil [11,13,14] are the most common clean-up. This procedure increases the analysis time and could produce blank contamination problems. Hence, alternative analytical methods which include simultaneous extraction and clean-up could be necessary.

One of these techniques is selective pressurized liquid extraction (SPLE) based on a PLE extraction with simultaneous in cell clean-up. This methodology was previously applied to the extraction of BPA and APs in sewage sludge following by the determination by gas chromatography mass spectrometry (GC–MS) [17]. However, the derivatization step to transform these compounds into volatile derivatives presents some disadvantages (such as more time for analysis or losses of analytes) and, consequently, greater error [2]. For this reason, liquid chromatography coupled with mass spectrometry should be employed in the analyses of these compounds [18].

The main objective of this paper is the development and validation of a novel, robust, accurate and sensitive analytical methodology for the determination of BPA and APs in marine sediments based on a selective pressurized liquid extraction (SPLE) with an in cell-clean up followed by the quantitation using LC–ESI–MS/MS. As far as we know, no previous works about the simultaneous extraction and clean-up of these pollutants in marine sediments using this methodology could be found in the literature. The main advantages of the proposed method were simplicity, automaticity, fastness and reduction in the analysis

Table 1

Analytical methodologies for the analysis of BPA and APs in sediments found in the literature (Web of ScienceTM) from 2008 to the present.

Analysed compounds	Sediment type	Amount of sample (g)	Extraction technique	Extraction parameters	Determination	Recovery (%)	Method quantitation limit	Reference
NP	River	2 g	PLE	Acetone:MeOH (50:50 v/v) temperature 50 °C static time, 3 × 1 min	HPLC–UVVis	75–85	0.015 µg g ⁻¹ (LOD)	[15]
BPA, 4-rOP, NP	Marine	1 g	US-SBSE	1) MeOH, 30 min 2) 6 h, 900 rpm	GC–MS	78–89	0.2–1.7 ng g ⁻¹	[31]
BPA, 4-rOP and NP	Marine	NM	US-SPE	DCM:MeOH (7/3 v/v) C18 cartridges	LC–MS/MS	NM	NM	[25]
BPA, 4-n-NP, NP	River	5 g	Soxhlet-SPE	DCM, 30 mL, 20 min LC-Si cartridges	GC–MS	94–103	0.15–0.50 ng g ⁻¹	[32]
BPA, NP	Marine	5 g	Digestion-LLE-SPE	Digestion in methanolic KOH hexane silica gel	GC–MS	94–98	NM	[33]
BPA, 4-rOP, NP	Marine	10 g	Soxhlet-SPE	DCM, 270 mL, 10 h silica gel	GC–MS	95–107	NM	[10]
BPA, NP	Marine	20 g	US-SPE	Acetone:MeOH (80:20 v/v), 2 h Florisil	LC–MS/MS	78–86	0.2–5.0 ng g ⁻¹	[14]
4-rOP, NP	River	1 g	US-SPE	DCM:hexane (10 min) hexane:acetone (10 min) Florisil	GC–MS/MS	84–107	38–48 ng g ⁻¹	[13]
4-rOP, NP	Marine	2.5 g	Soxhlet-SPE	DCM, 20 h Florisil	HPLC–FLD	NM	0.2–0.5 ng g ⁻¹	[11]
4-rOP, NP	River	10 g	Soxhlet-SPE	DCM, 48 h silica gel	GC–MS	NM	NM	[16]
		10 g (+10 g sand)	PLE-SPE	Toluene:MeOH (1:6) temperature 100 °C static time, 5 min silica gel		NM	NM	[16]

DCM, dichloromethane; FLD, fluorescence detection; GC, gas chromatography; HPLC, high performance liquid chromatography; LC, liquid chromatography; LLE, liquid liquid extraction; MeOH, methanol; MS, mass spectrometry; NM, not mentioned; PLE, pressurized liquid extraction; SBSE, stir bar sorption extraction; SPE, solid phase extraction; US, sonication; UV–vis, ultraviolet–visible.

time and the use of organic solvents, according to the principles of Green Chemistry. Because of the low method quantitation limits achieved and the low amount of sample employed (0.5 g of sediment) this methodology could be an important tool in monitoring programs, in order to research the fate and occurrence of BPA and APs and to ensure the good quality of marine environment. Finally, the methodology was satisfactorily applied to the analysis of marine sediment samples in Galician coast (NW Spain) to obtain a first draw of the presence of these compounds and to have an approach of the possible damage to the aquatic biota of this region.

2. Experimental

2.1. Standards and reagents

Nonylphenol technical mixture (NP) 94% purity ($\pm 1\%$ tolerance) and 4-*n*-nonylphenol (4-*n*-NP) 99.9% purity ($\pm 0.5\%$ tolerance) were from Riedel-de Haën (Seelze, Germany). Bisphenol A (BPA) 99% purity ($\pm 0.5\%$ tolerance), 4-*tert*-octylphenol (4-*t*OP) 97% purity ($\pm 0.5\%$ tolerance) and 4-octylphenol (4-*o*P) 99% purity ($\pm 0.5\%$ tolerance) were obtained from Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany). All standard solutions (1000, 10 and 1 mg L⁻¹) containing all the compounds were prepared in methanol (SPS grade) from Romil Ltd. (Cambridge, United Kingdom) and stored at 4 °C.

As internal standards, 4-*n*-nonylphenol-2,3,5,6-*d*₄ (4-*n*-NP-*d*₄) 99.3% was obtained from CDN Isotopes (Pointe-Claire, Canada) and solution of bisphenol A-*d*₁₆ (BPA-*d*₁₆) 99.5% in acetonitrile (100 mg L⁻¹) was from Dr. Ehrenstorfer GMBH (Augsburg, Germany).

For the extraction, methanol Super Purity from Romil was used (Cambridge, UK). Basic and neutral alumina activity grade I and octadecyl functionalised silica gel (C18), Florisil and silica gel were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). All sorbents were previously activated in a muffle furnace for 12 h at 130 °C (silica gel), 350 °C (basic and neutral alumina) and 450 °C (Florisil). Then, all of them were 5% water deactivated and shaken by hand for 30 min.

For the determination, methanol LC–MS PAI and ammonia (30%) for instrumental analysis were from Panreac (Barcelona, Spain). Ultrapure water was purified with a Direct 5 Milli Q system (Millipore, Bedford, MA, USA).

2.2. Sample collection

Marine sediment samples were collected in different sampling points located in Galicia coast (NW Spain). A Van-Veen Grab sampler was employed for the sampling of surface sediments (0–5 cm depth). Sediment samples were frozen at –20 °C, then freeze-dried, homogenised and sieved by 250 µm in the laboratory.

2.3. Simultaneous extraction and clean up procedure

An accelerated extraction solvent system ASE 200 instrument (Dionex, Sunnyvale, CA, U.S.A.) equipped with stainless steel extraction cells (11 mL) was employed to perform the SPLE procedure.

Each extraction cell was sealed at both ends with glass-fiber filters (Ø 19.8 mm) from Whatman (Kent, UK) and filled with the retainer sorbent, dispersant agent and lyophilised sample, as it is shown in Fig. 1.

Two grams of basic alumina was placed at the bottom of the extraction cell for the simultaneous clean-up of the co-extracts. This retainer sorbent was previously activated and 5% water deactivated as it was commented before. Samples (0.5 g of freeze-dried marine sediment) and dispersant agent (1.4 g of C18) were blended in an agate mortar during 5 min until homogenization.

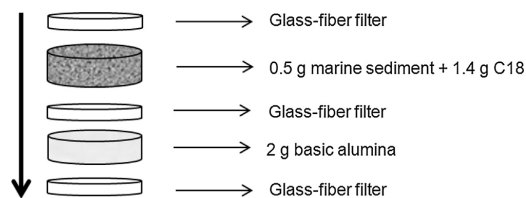


Fig. 1. Scheme of a filled extraction cell.

Methanol was chosen as extraction solvent. The operating PLE extraction conditions were: temperature, 150 °C; pressure 1500 psi; number of extraction cycles, 1; preheat time, 3 min; heat time, 5 min; static time 10 min; flush volume 60% and purge time, 60 s.

The PLE extracts were evaporated until dryness at 50 °C during 45 min in a Syncore[®] Analyst evaporator from Büchi Labortechnik AG (Flawil, Switzerland) and reconstituted in 1 mL of methanol. Finally, the obtained extracts were passed through a 0.2 µm syringe filter of PTFE (Teknokroma, Barcelona, Spain) before LC injection in order to remove any solid particles that might interfere in the analysis and damage the instrument.

2.4. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry

The LC–MS/MS protocol was previously optimized and described in Salgueiro-González et al. [19] using an Agilent HP-1200 Series LC system equipped with an autosampler, a binary solvent pump and a thermostated column oven. Briefly, the chromatographic separation was carried out with a column Hypersil Gold C18 (150 × 2.1 mm), 3 µm Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA), and a mobile phase gradient water/methanol with 0.05% of ammonia as an eluent modifier. The proportion of the organic solvent during the chromatographic run (14 min) was as follows: 0 min – 20%, 1 min – 20%, 5 min – 100%, 12 min – 100%, 14 min – 20%. The system was re-equilibrated for 7 min between runs. The injection volume was 25 µL.

LC system was coupled to a mass spectrometer with a triple quadrupole detector (API 3200, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) equipped with an APCI/ESI source. All compounds were detected with ESI interface operating in negative mode.

2.5. Quality assurance and quality control

Multiple-reaction monitoring (MRM) was chosen as a data acquisition mode because it allows high sensitivity and selectivity. In all cases, four identification points (one precursor ion and two products ions) were selected according to the Decision 2002/657/EC [20].

Retention time and MRM ratio (relation between the two MRM transitions) were also used as a criterion for the identification of the compounds. For quantitation, deuterated internal standards were used in order to correct matrix effect. BPA-*d*₁₆ was used as BPA internal standard whereas 4-*n*-NP-*d*₄ was used to determine APs. All these parameters were shown in Table 2.

2.6. Blank contamination considerations

Blank contamination problems in the analysis of these compounds at ultratrace levels were considered and minimized in previous works [18,21]. Consequently, ASE glass fibre filters were pre-cleaned by PLE extraction with methanol at 150 °C at 2000 psi during 5 min. Moreover, the sorbents (C18 and basic alumina) were also washed with methanol (extraction solvent) by sonication

Table 2
Parent and fragment ions, retention times and MRM ratio for each compound.

Analyte	t_R (min)	Precursor ion (m/z)	Product ions (m/z)	MRM ratio ^b
BPA-d ₁₆	9.39 ± 0.06	241 (M-D) ⁺	142 ^a 221	1.6 ± 0.1
BPA	9.40 ± 0.03	227 (M-H) ⁺	212 ^a 133	15.7 ± 2.8
4-tOP	10.62 ± 0.08	205 (M-H) ⁺	133 ^a 116	8.9 ± 0.3
NP	10.89 ± 0.09	219 (M-H) ⁺	133 ^a 116	5.8 ± 0.1
4-OP	10.99 ± 0.01	205 (M-H) ⁺	106 ^a	–
4-n-NP	11.23 ± 0.07	219 (M-H) ⁺	106 ^a 119	22.4 ± 0.4
4-n-NP-d ₄	11.23 ± 0.07	223 (M-D) ⁺	109 ^a 129	14.4 ± 1.1

^a Quantitation ion.^b Ratio and tolerances between quantification and confirmation MRM transitions according to Decision 2002/657/EC [34].

during 15 min and dried under nitrogen stream before the extraction procedure.

In this way, procedural blanks were frequently revised and kept lower than 0.05 ng g⁻¹ for all compounds except for BPA (0.2 ng g⁻¹), 4-tOP (0.9 ng g⁻¹) and NP (1.7 ng g⁻¹).

3. Results and discussion

3.1. Optimization of SPLE conditions

The SPLE efficiency could be affected by many factors such as temperature, solvent, extraction time and clean up sorbent. All these parameters should be considered in the optimization step. Before the extraction assays, samples were spiked with a small amount of standard solution and placed into the PLE cell during 24 h at 4 °C [13]; in this way, real interactions between analytes and sample were supposed.

The first parameter taking into account was the clean-up sorbent. Neutral and basic alumina, Florisil and silica gel were tested ($n = 3$) to select the best option for reducing interferences in the analysis. All sorbents were previously cleaned with methanol and activated in the furnace as it was explained in Section 2.1.

A small amount of marine sediment sample (0.5 g freeze-dried) was spiked at level of 200 ng g⁻¹ for all compounds and mixed with octadecyl functionalized silica gel (C18; 1.5 g) employed as a

dispersant agent. At the bottom of the extraction cell three grams of each sorbent was placed. The rest of conditions were: temperature, 40 °C; pressure, 1500 psi; preheat time, 3 min; heat time, 5 min; flush volume 60% and purge time, 60 s [18].

As can be seen in Fig. 2, NP blank interferences were observed when Florisil and silica gel were used ($R\% > 200\%$); therefore, these sorbents were discarded. Similar recoveries were obtained for almost all compounds with neutral and basic alumina; however, in the case of BPA and 4-tOP lower recovery were shown (<30%). Furthermore, standard deviation was higher with neutral alumina. For all these reasons, basic alumina was chosen for clean-up step.

For studying the other PLE conditions, an experimental design was performed. In this manner, a reduction in the number of assays was possible in comparison with a univariate optimization. Moreover, interactions between factors could be analysed.

A Plackett–Burman 2⁷ × 3/32 design with five experimental factors (temperature, number of cycles, use of dispersant agent (0.5 g), static time and amount of clean up sorbent) was performed. To reach the orthogonally conditions, the introduction of two dummies factors was necessary; moreover, dummies allow to determine system errors of the analytical methodology. High and low values for each factor (Table 3) were selected considering our system knowledge and previous experience. Plackett–Burman matrix (which contains the value of each factor in each experiment) was obtained using the statistical program Statgraphics Plus 4.0 routine for Windows (Statgraphics Graphics Corporation, STSC, USA).

Once these experiments were carried out ($n = 3$), the analysis of the results was realised via standardised ($P = 95.0\%$) main effect Pareto charts. In these charts, factors are individually represented by bars in descending order according to their standardised effect, which is the ratio between estimated effect and its standard error, equivalent to computing a t -statistic for each effect [22]. Furthermore, a vertical line on the chart delineates the effects that are statistically significant. Bars that extend beyond the line correspond to effects that are statistically significant at the 95% confidence level.

Fig. 3 shows first order Pareto charts obtained for some of the target compounds. As it can be seen, no significant factors were found in the range studied for BPA (Fig. 3a) whereas dispersant agent and temperature were significant factors for NP (Fig. 3b) and 4-tOP (Fig. 3c) respectively. The other involved parameters were not statistically significant. Two-factor interaction Pareto chart ($P = 95.0\%$) were also taken into account; nevertheless, no interactions between variables were observed. Values of the no

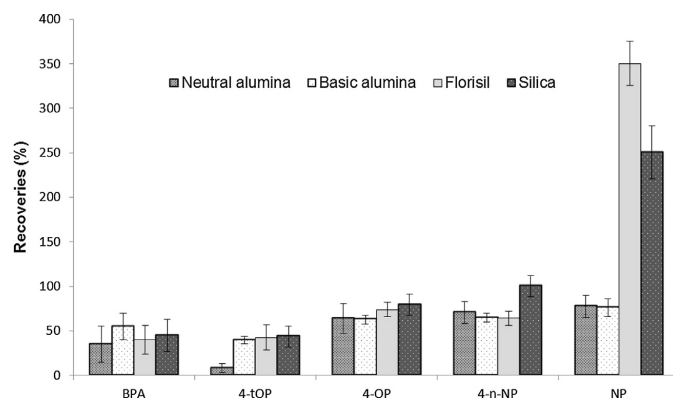


Fig. 2. Selection of the sorbent in the clean-up step ($n = 2$).

Table 3

High and low values selected in the Plackett–Burman design.

Factors	Minimum value	Maximum value
A Temperature (°C)	40	100
B Number of cycles	1	2
C Dispersant agent 0.5 g C18 ^a	0	1
D Static time (min)	5	15
E Amount of basic alumina (g)	1	4
F Dummy 1	–1	1
G Dummy 2	–1	1

^a Assays with (1) and without (0) dispersant agent were carried out.

significant parameters were selected according to the sign of the estimated effect as well as other experimental conditions. Consequently, number of cycles (B) and static time (D) were minimized and the total analysis time was reduced. Meanwhile, 2 g of basic alumina was chosen reducing the use of sorbent and the waste generation.

In the next step, temperature (A) and amount of dispersant agent (C) were optimized by an orthogonal central composite design (2² + star) which studied the effects of these factors in 10 randomised runs. Low and high values for each factor were established according to the positive or negative sign of the experimental field definition; for temperature, values between 75 and 185 °C were chosen whereas the amount of dispersant agent ranged from 0.5 to 1.5 g. The results of the experiment were analysed by the response surface plot. This is a three-dimensional plot of the relationship between the estimated dependent variable and two selected variables. Fig. 4 shows the response surface plots obtained for 4-OP and NP. As it can be seen in Fig. 4a, a decrease in the estimated response for 4-OP took place when more than 1.25 g of C18 was employed. For the rest of compounds, the optimal value

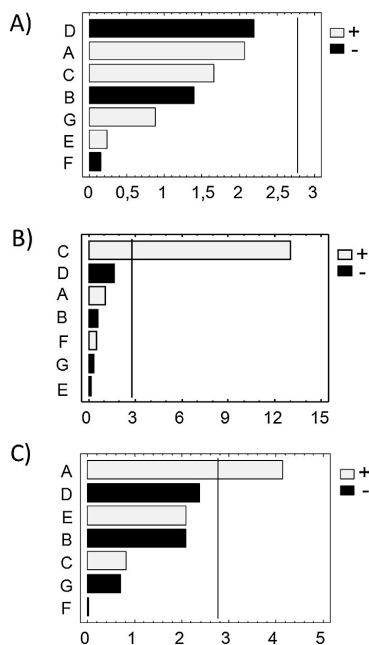


Fig. 3. Standardised Pareto chart obtained for BPA (A), NP (B) and 4-tOP (C). The studied factors were: A, temperature (°C); B, number of cycles; C, dispersant agent; D, amount of basic alumina (g); E, static time (min); F, dummy; G, dummy. Scale in the x-axis is the standardised effect for each factor.

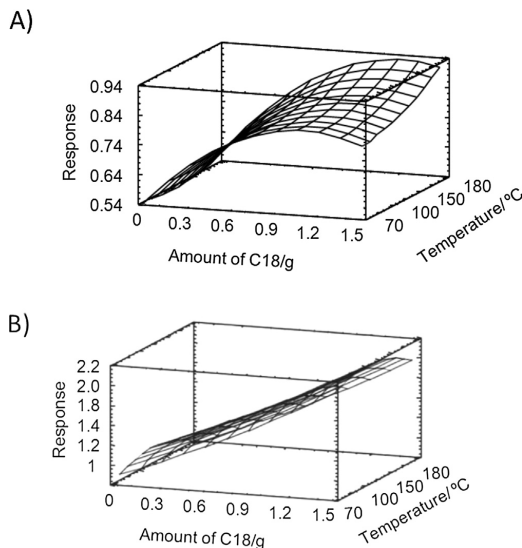


Fig. 4. Estimated response surface from the central composite design obtained for the pair temperature/amount of dispersant agent for (a) 4-OP and (b) NP extraction.

was 1.5 g of dispersant agent. Meanwhile, the estimated response for NP (Fig. 4b) significantly decreased with temperatures higher than 130 °C whereas an optimal temperature of 185 °C was obtained for the rest of compounds. However, and in order to lead a compromise, the selected values for temperature and amount of dispersant agent were 150 °C and 1.4 g, respectively.

The final conditions of the SPLE procedure were briefly commented in the following lines: solvent extraction, methanol; pressure, 1500 psi; temperature, 150 °C; static time, 10 min; number of cycles, 1 cycle; dispersant agent, 1.4 g of C18; clean-up sorbent, 2 g of basic alumina. In this manner, a tedious clean-up step would be replaced by an automatic one, reducing sample handling and the extraction time.

Finally, a chromatogram of a lyophilised marine sediment sample spiked at a 100 ng g^{–1} concentration level of all compounds is shown in Fig. 5.

3.2. Matrix effect

Matrix constituents which coelute with the target analytes can either suppress or enhance signal response in the LC-ESI-MS/MS, modifying the ionisation efficiency of the electrospray interface [23]. This phenomenon is called matrix effect (ME).

Different ways to assess ME could be found in the literature [24]. In this study, the peak areas obtained when a standard solution in methanol (A_s) is injected in the LC-MS (150 µg L^{–1} of each compounds) was compared to the peak areas belong to a spiked marine sediment sample (A_{mss}) at the same level of concentration and the peak areas measured for a non-spiked sample extract (A_{ms}), according to the following equation:

$$ME(\%) = \frac{(A_{mss} - A_{ms}) \times 100}{A_s}$$

ME should be equal to 100% in absence of matrix effect. However, suppression ion gives a percentage inferior to 100% and enhancement a superior one. In all cases, ME ranged from 25 to 37% for all compounds, which demonstrate an elevate signal

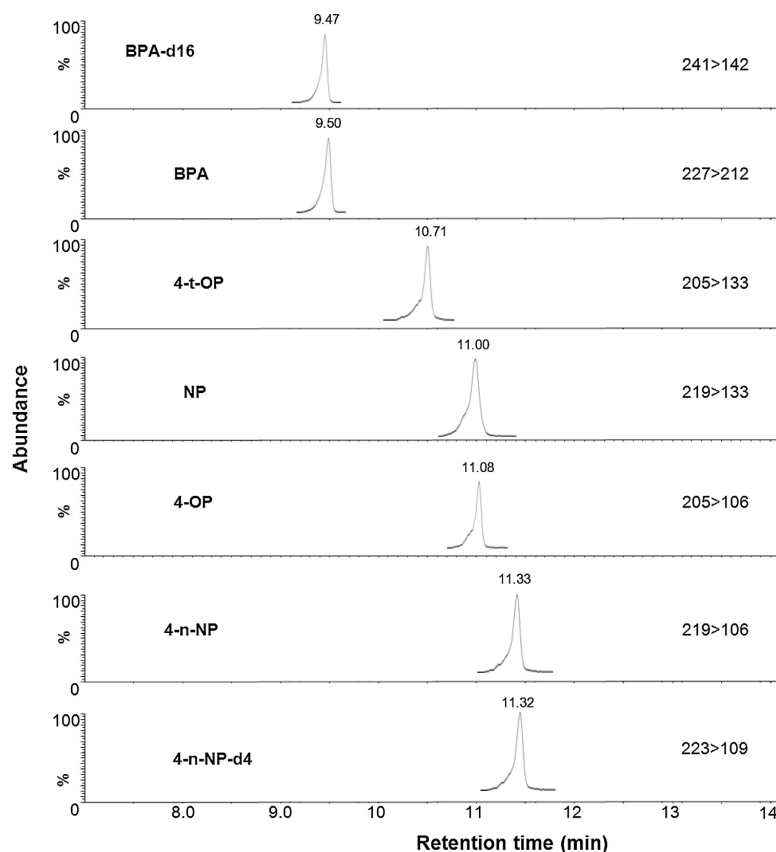


Fig. 5. MRM chromatogram corresponding to the analysis of a marine sediment (100 ng g^{-1} of all compounds) using the developed method.

suppression due to the marine sediments constituents. For this reason, standard addition curves were used for the quantitation of the target compounds in order to ensure reliable results.

3.3. Method validation

The optimized analytical methodology was validated using spiked marine sediment samples because there are not certificated

reference materials available of these compounds in this type of matrix. Linear range, sensitivity, accuracy, precision and uncertainty are evaluated and showed in Table 4.

Linearity ($r > 0.9985$) was evaluated between 0.001 and 10000 ng g^{-1} using ten calibration points ($n = 3$). The response was linear between the MQL and 2000 ng g^{-1} for all compounds.

Precision and accuracy were determined at two levels of concentration distributed over the linear range (20 and 200 ng g^{-1}

Table 4
Recovery, precision and uncertainty of target compounds in marine sediment samples with SPLE-LC-MS/MS.

Analyte	Concentration in sample \pm uncertainty ^a (ng g^{-1})	Accuracy (%)			Experimental limits	
		Recovery ($n = 6$)	Repeatability ($n = 6$)	Intermediate precision ($n = 10$)	Method detection limits (ng g^{-1})	Method quantitation limits (ng g^{-1})
BPA	20 ± 3.4	94	4	5	0.97	2.86
	200 ± 34	100	1	2		
4-t-OP	20 ± 4	97	4	5	0.87	2.85
	200 ± 12	100	4	4		
4-OP	20 ± 4.2	95	2	6	0.09	0.26
	200 ± 20	99	2	5		
4-n-NP	20 ± 2.6	99	2	3	0.05	0.17
	200 ± 6	99	4	5		
NP	20 ± 4.2	95	4	6	1.2	4.01
	200 ± 14	97	4	5		

^a Expanded uncertainty (U) about the mean with coverage factor 2 (95% of confidence).

Table 5

Concentrations (ng g⁻¹ dry weight) of BPA and APs in marine sediment samples collected in Galicia coast.

Analyte	M1	M2	M3	M4	M5
BPA	n.d.	n.d.	n.d.	11.0	n.d.
4-tOP	35.0	35.2	38.9	20.1	28.0
4-OP	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
4-n-NP	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
NP	1139	1409	992	190	453

n.d.: not detected.

in marine sediment samples). Recoveries of spiked samples were calculated using an addition standard calibration curve with five points (0–800 ng g⁻¹). Mean recoveries ($n=6$) ranged from 94–100% for all concentrations and all compounds. Using the same standard addition curve, repeatability and intermediate precision were calculated as RSD of concentrations, using seven replicates analysed the same day and the same analyst and equipment and ten replicates with the proposed method during different days along two weeks and the same analyst and equipment. In all cases, the repeatability and the intermediate precision of the method were satisfactory, with RSD < 6%.

Uncertainty of the analytical method was also estimated on the basis of in-house validation data according to EURACHEM/CITAC guide for all compounds at two spiking levels, as it was explained in previous works. The relative expanded uncertainty was lower than 20% for all compounds.

The method detection limit (MDL) and method quantitation limit (MQL) were estimated as $X_b + 3SD_b$ (X_b , average and SD_b , standard deviation of the ten blank marine sediment samples) and $X_b + 10SD_b$, respectively. Due to the fact that blank marine sediment samples are not easily found, samples from pristine areas were selected. These values are shown in Table 4 and ranged from 0.17 (4-n-NP) to 4.01 ng g⁻¹ (NP).

3.4. Comparison to previously reported methods

As it was commented before, and to the best of our knowledge, this is the first analytical method based on the determination of BPA and APs in marine sediment by SPLE-LC-MS/MS. In comparison with other reported methods (Table 1), the proposed methodology has important improvements and advantages. Firstly, the analytical procedure was optimized and exhaustively validated for five compounds, against other methods which considered less than three of them.

Furthermore, the extraction and clean up were simultaneously performed which simplifies the experimental procedure and reduce the sample handling, avoiding sources of contamination. Moreover, small volumes of toxic solvent were consumed contrary to classic extraction techniques, according to the principles of Green Chemistry. The LC-ESI-MS/MS detection offers high sensitivity and selectivity avoiding the additional derivatization step required in GC-MS. Finally, greater recoveries (94–100%) and lower method quantitation limits (<4.01 ng g⁻¹) were obtained compared with almost all previous methodologies.

For all these reasons, and taking into account the small amount of sample (0.5 g of dried sediment) employed, this method could be a useful tool in monitoring programs to control the presence of these compounds in marine environment.

3.5. Levels of BPA and APs in marine sediment samples: evaluation of sediment toxicity

In order to demonstrate the feasibility and applicability of the proposed method and to obtain a first picture about the presence of BPA and APs in Galicia coast (NW Spain), some marine sediment samples were analysed.

As it can be seen in Table 5, BPA was detected in only one sample (M4) at level of concentration of 11.0 ng g⁻¹. The LC-MS/MS chromatogram of this sample was shown in Fig. 6. Linear isomers (4-OP and 4-n-NP) were not found in any sample; nevertheless, branched isomers (4-tOP and NP) were measured in all of them. Concentrations of 4-tOP ranged between 20.1 and 38.9 ng g⁻¹ whereas NP varied from 190 to 1409 ng g⁻¹.

Concentrations of BPA obtained in this study are similar to the reported levels in other coastal zones such as Bay of Biscay [25]. For APs, similar concentrations were measured in Masan Bay (Korea) [26] whereas higher concentrations (more than ten times) were shown in coastal zones near sewage treatment plants of Tokyo Bay (20,700 ng g⁻¹) or Jamaica Bay (13,700 ng g⁻¹) [7].

As an approach, the sediment toxicity was estimated in order to evaluate the potential risk to the aquatic fauna of Galicia coast. For this purpose, sediment concentrations of the target compounds were converted to toxic units (TU) by means of acute toxicity data (LC50). The TU was introduced by Sprague in 1970 and assumed an additive behaviour of one mixture of compounds [27]. Different studies suggested that potential effects of organic pollutants in invertebrates species were found when TU values greater than 0.001 [28].

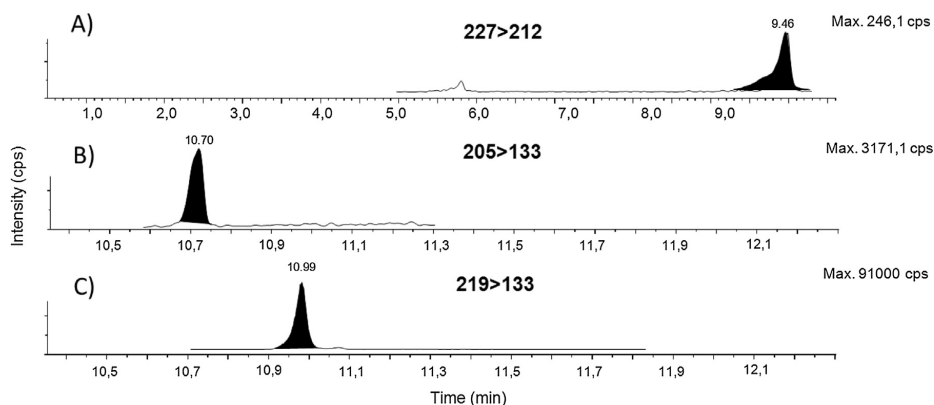


Fig. 6. Analysis of a real marine sediment sample (M4) collected at the Galician coast. Only compounds positively identified and quantified are shown (A) BPA, (B) 4-tOP and (C) NP

Due to the fact that LC50 values were obtained in aqueous medium, water concentrations were predicted using an equilibrium partitioning [29]. Consequently, TU were calculated according to the following equation [28]:

$$TU = \frac{C_i}{LC50_i}$$

where C_i is the water concentration of the compound i and LC50 _{i} is its predicted acute lethal concentration in a standard toxicity test.

In this study, *Americamysis bahia* (invertebrate species) and *Danio rerio* (fish) were considered. The toxicity values LC50–96 h for these species were taken from ECOTOX database and ranged from 0.5 to 8.04 mg L^{−1} [30]. Sediment concentrations below the quantitation limits were excluded from the prediction of these values in order to avoid overestimation of possible risk. For invertebrates, TU values between 2.2 10^{−6} (BPA) and 1.12 10^{−4} (NP) were predicted; meanwhile, TU for fishes ranged from 9.04 10^{−7} (BPA) to 1.8 10^{−5} (NP). In all cases, no potential risk to biota was found.

4. Conclusions

A novel and automatic analytical methodology based on a SPLE-LC–MS/MS for the analysis of BPA and APs was developed and validated. This method enables the simultaneous extraction and clean-up of all the target compounds from complex matrices in one step, reducing the analysis time and the use of organic solvents according to the principles of Green Chemistry.

Satisfactory precision and accuracy were obtained with the proposed analytical methodology. Moreover, the sensitivity and selectivity of the method allow the achievement of low method quantitation limits using a small amount of sample.

The applicability of the proposed method to marine sediment samples proved its practicability. NP and 4-tOP were measured in all samples which show the ubiquity of these compounds. However, no risk to the aquatic fauna was found.

For all reasons commented before, this analytical methodology could be incorporated in marine monitoring programs to obtain a database of the concentration of these compounds in marine sediments and control the quality of the marine environment.

Acknowledgements

This work has been financially supported by Program of Consolidation and Structuring of Units of Competitive Investigation of the University System of Galicia (Xunta de Galicia) potentially cofinanced by ERDF in the frame of the operative Program of Galicia 2007–2013 (Ref. GRC2013-047), Spanish Ministry of Economy and Competitiveness cofinanced by ERDF (CTM2013-48194-C3-2-R) and the Team Miño Project (Programa Cooperación Transfronteriza España-Portugal 2007–2013). The authors would like to thank the staff of the Spanish Oceanographic Institute (IEO) for their cooperation. N. Salgueiro-González acknowledges Xunta de Galicia and Campus do Mar International Campus of Excellence for Ph.D. grant and G. Fernández-Martínez (SAI-UDC) by the LC–MS/MS support.

References

- [1] B. Singh, A. Kumar, A.K. Malik, Recent advances in sample preparation methods for analysis of endocrine disruptors from various matrices, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 44 (3) (2014) 255–269.
- [2] T. Vega Morales, M.E. Torres Padron, Z. Sosa Ferrera, J.J. Santana Rodriguez, Determination of alkylphenol ethoxylates and their degradation products in liquid and solid samples, *Trac-Trend. Anal. Chem.* 28 (10) (2009) 1186–1200.
- [3] J.O. Tijani, O.O. Fatoba, L.F. Petrik, A review of pharmaceuticals and endocrine-disrupting compounds: sources, effects, removal, and detections, *Water Air Soil Pollut.* 224 (11) (2013).
- [4] Directive, Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council of 12 August 2013 amending Directives 2000/60/EC as regards priority substances in the field of water policy, 2013.
- [5] Directive, Directive 2008/105/EC of Parliament and of the Council of 16 December 2008 on environmental quality standards in the field of water policy, amending and subsequently repealing Council Directives 82/176/EEC, 83/513/EEC, 84/156/EEC, 84/491/EEC, 86/280/EEC and amending Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council, 2008.
- [6] Z.-h. Liu, Y. Kanjo, S. Mizutani, Removal mechanisms for endocrine disrupting compounds (EDCs) in wastewater treatment—physical means, biodegradation, and chemical advanced oxidation: a review, *Sci. Total Environ.* 407 (2) (2009) 731–748.
- [7] A. David, H. Fenet, E. Gomez, Alkylphenols in marine environments: distribution monitoring strategies and detection considerations, *Mar. Pollut. Bull.* 58 (7) (2009) 953–960.
- [8] Directive, Directive 2008/56/EC of the European Parliament and of the Council of 17 June 2008 establishing a framework for community action in the field of marine environmental policy (Marine Strategy Framework Directive), 2008.
- [9] COM, Common Implementation Strategy for the Water Framework Directive (2000/60/EC). Guidance No.25 on chemical monitoring of sediment and biota under the Water Framework Directive, 2010.
- [10] S. Mortazavi, A.R. Bakhtiari, A.E. Sari, N. Bahramifar, F. Rahbarizade, Phenolic endocrine disrupting chemicals (EDCs) in Anzali Wetland, Iran: elevated concentrations of 4-nonylphenol, octylphenol and bisphenol A, *Mar. Pollut. Bull.* 64 (5) (2012) 1067–1073.
- [11] K. Senthil Kumar, K.S. Sajwan, J.P. Richardson, K. Kannan, Contamination profiles of heavy metals: organochlorine pesticides, polycyclic aromatic hydrocarbons and alkylphenols in sediment and oyster collected from marsh/estuarine Savannah GA, USA, *Mar. Pollut. Bull.* 56 (1) (2008) 136–149.
- [12] Y. Liu, Y.T. Guan, N.F.Y. Tam, T. Mizuno, H. Tsuno, W.P. Zhu, Influence of rainfall and basic water quality parameters on the distribution of endocrine-disrupting chemicals in coastal area, *Water Air Soil Pollut.* 209 (1–4) (2010) 333–343.
- [13] J. Sánchez-Avila, M. Fernandez-Sanjuan, J. Vicente, S. Lacorte, Development of a multi-residue method for the determination of organic micropollutants in water, sediment and mussels using gas chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* (2011) 6799.
- [14] G. Pojana, A. Gomiero, N. Jonkers, A. Marcomini, Natural and synthetic endocrine disrupting compounds (EDCs) in water, sediment and biota of a coastal lagoon, *Environ. Int.* 33 (7) (2007) 929.
- [15] A.M. Reid, C.A. Brougham, A.M. Fogarty, J.J. Roche, Accelerated solvent-based extraction and enrichment of selected plasticisers and 4-nonylphenol, and extraction of tin from organotin sources in sediments, sludges and leachate soils, *Anal. Chim. Acta* 634 (2) (2009) 197–204.
- [16] J. Gong, L. Xu, Y. Yang, D.Y. Chen, Y. Ran, Sequential ASE extraction of alkylphenols from sediments: occurrence and environmental implications, *J. Hazard. Mater.* 192 (2) (2011) 643–650.
- [17] M.P. Martínez-Moral, M.T. Tena, Focused ultrasound solid–liquid extraction and selective pressurised liquid extraction to determine bisphenol A and alkylphenols in sewage sludge by gas chromatography–mass spectrometry, *J. Sep. Sci.* 34 (18) (2011) 2513–2522.
- [18] N. Salgueiro-González, I. Turnes-Carou, S. Muniategui-Lorenzo, P. Lopez-Mahia, D. Prada-Rodríguez, Fast and selective pressurized liquid extraction with simultaneous in cell clean up for the analysis of alkylphenols and bisphenol A in bivalve molluscs, *J. Chromatogr. A* 1270 (2012) 80–87.
- [19] N. Salgueiro-González, E. Concha-Graña, I. Turnes-Carou, S. Muniategui-Lorenzo, P. López-Mahía, D. Prada-Rodríguez, Determination of alkylphenols and bisphenol A in seawater samples by dispersive liquid–liquid micro-extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry for compliance with Environmental Quality Standards (Directive 2008/105/EC), *J. Chromatogr. A* 1223 (2012) 1–8.
- [20] Decision, Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, 2002.
- [21] N. Salgueiro-González, E. Concha-Graña, I. Turnes-Carou, S. Muniategui-Lorenzo, P. López-Mahía, D. Prada-Rodríguez, Blank and sample handling troubleshooting in ultratrace analysis of alkylphenols and bisphenol A by liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Talanta* 101 (2012) 413–419.
- [22] E. Concha-Grana, M.I. Turnes-Carou, S. Muniategui-Lorenzo, P. Lopez-Mahia, E. Fernandez-Fernandez, D. Prada-Rodríguez, Improvement of sensitivity in the determination of organochlorine pesticides using a PSS injector with GC-ECD, *Anal. Bioanal. Chem.* 379 (7–8) (2004) 1120–1126.
- [23] A. Furey, M. Moriarty, V. Bane, B. Kinsella, M. Lehan, Ion suppression; a critical review on causes, evaluation, prevention and applications, *Talanta* 115 (2013) 104–122.
- [24] T. Benijts, R. Dams, W. Lambert, A. De Leenheer, Countering matrix effects in environmental liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry water analysis for endocrine disrupting chemicals, *J. Chromatogr. A* 1029 (1–2) (2004) 153–159.
- [25] E. Puy-Azurmendí, M. Ortiz-Zarragoitia, M. Kuster, E. Martínez, M. Guillamin, C. Domínguez, T. Serrano, M.C. Barbero, M.L. Alda, J.M. Bayona, D. Barcelo, M.P. Cajaraville, An integrated study of endocrine disruptors in sediments and

- reproduction-related parameters in bivalve molluscs from the Biosphere's Reserve of Urdaibai (Bay of Biscay), *Mar. Environ. Res.* 3 (2010) .
- [26] D. Li, M. Dong, W.J. Shim, U.H. Yim, S.H. Hong, N. Kannan, Distribution characteristics of nonylphenolic chemicals in Masan Bay environments: Korea, *Chemosphere* 71 (6) (2008) 1162–1172.
- [27] J. Sprague, Measurement of pollutant toxicity to fish. II. Utilizing and applying bioassay results, *Water Res.* 4 (1970) 3–32.
- [28] M.A. Wetzel, D.-S. Wahrendorf, P.C. von der Ohe, Sediment pollution in the Elbe estuary and its potential toxicity at different trophic levels, *Sci. Total Environ.* 449 (2013) 199–207.
- [29] C.H. Di Toro, D. Berry, W. Swartz, R. Cowan, C. Pavlou, S. Allen, H. Thomas, N. Paquin, Technical basis for establishing sediment quality criteria for nonionic organic chemicals using equilibrium partitioning, *Environ. Toxicol. Chem.* 10 (1991) 1541–1583.
- [30] USEPA, ECOTOX 4.0 ecotoxicology database. 2008.
- [31] J. Llorca-Pórcel, M. Martínez-Parreño, E. Martínez-Soriano, I. Valor, Analysis of chlorophenols, bisphenol-A, 4-*tert*-octylphenol and 4-nonylphenols in soil by means of ultrasonic solvent extraction and stir bar sorptive extraction with in situ derivatisation, *J. Chromatogr. A* 1216 (32) (2009) 5955–5961.
- [32] C. Liu, B. Zhao, Y. Zhang, The influence of aerosol dynamics on indoor exposure to airborne DEHP, *Atmos. Environ.* 44 (16) (2010) 1952–1959.
- [33] S.L. Klosterhaus, R. Grace, M.C. Hamilton, D. Yee, Method validation and reconnaissance of pharmaceuticals, personal care products, and alkylphenols in surface waters, sediments, and mussels in an urban estuary, *Environ. Int.* 54 (2013) 92–99.
- [34] Decision, Commission Decision (2002/657/EC): implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results., 2002.

ANEXO V

Pressurized hot water extraction followed by miniaturized
membrane assisted solvent extraction for the green analysis of
alkylphenols in sediments

J Chromatogr A, 1383 (2015) 8-17



Pressurized hot water extraction followed by miniaturized membrane assisted solvent extraction for the green analysis of alkylphenols in sediments[☆]



N. Salgueiro-González, I. Turnes-Carou, S. Muniategui-Lorenzo^{*}, P. López-Mahía, D. Prada-Rodríguez

Grupo Química Analítica Aplicada (QANAP), Instituto Universitario de Medio Ambiente (IUMA), Departamento de Química Analítica, Facultade de Ciencias, Universidade da Coruña Campus de A Coruña, E-15071 A Coruña, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 October 2014

Received in revised form 5 January 2015

Accepted 9 January 2015

Available online 15 January 2015

Keywords:

Alkylphenols

Pressurized hot water extraction

Miniaturized membrane assisted solvent extraction

Liquid chromatography tandem mass spectrometry

Green Chemistry

Analytical Eco-Scale

ABSTRACT

A novel and Green analytical methodology for the determination of alkylphenols (4-*tert*-octylphenol, 4-*n*-octylphenol, 4-*n*-nonylphenol, nonylphenol) in sediments was developed and validated. The method was based on pressurized hot water extraction (PHWE) followed by miniaturized membrane assisted solvent extraction (MASE) and liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry detection (LC–ESI–MS/MS). The extraction conditions were optimized by a Plackett–Burman design in order to minimize the number of assays according to Green principles. Matrix effect was studied and compensated using deuterated labeled standards as surrogate standards for the quantitation of the target compounds. The analytical features of the method were satisfactory: relative recoveries varied between 92 and 103% and repeatability and intermediate precision were <9% for all compounds. Quantitation limits of the method (MQL) ranged from 0.061 (4-*n*-nonylphenol) to 1.7 ng g^{−1} dry weight (nonylphenol). Sensitivity, selectivity, automaticity and fastness are the main advantages of the exposed methodology. Reagent consumption, analysis time and waste generation were minimized. The “greenness” of the proposed method was evaluated using an analytical Eco-Scale approach and satisfactory results were obtained. The applicability of the proposed method was demonstrated analysing sediment samples of Galicia coast (NW of Spain) and the ubiquity of alkylphenols in the environment was demonstrated.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Alkylphenols (APs) are the degradation products of alkylphenol polyethoxylates (APEOs) which are largely used in domestic and industrial applications as non-ionic surfactants in detergents, emulsifiers, dispersants and plasticizers [1]. Concerning their toxicity, APs are recognized as endocrine disrupting compounds (EDCs) which are natural and synthetic compounds that can alter the functioning of the endocrine system, that is, development, growth, reproduction and behavior of human beings and animals at low concentration [2].

These pollutants enter into the environment through wastewater treatment plants discharges where these compounds are slightly removed [3] and distribute in water, suspended particles or

accumulated in sediment and biota. Hence, the analysis of contaminants in all these matrices is necessary to control chemical pollution and maintain a good environmental status of aquatic environment, as it is recommended in the recent Directive 2013/39/EU [4] as regards priority substances in the field of water policy amending Directive 2000/60/EC and Directive 2008/105/EC.

Monitoring and biomonitoring programs are required to achieve these objectives. Although water monitoring is mainly used to evaluate the presence of pollutants in aquatic environment, other matrix such as sediments or biota could be also considered [5]. Sediments act both as a long-term pollutant sink and reservoir and as a source of contaminants through re-suspension [6]. Furthermore, and due to their hydrophobicity, APs tend to be settled to bottom sediments and accumulated continuously. For all these reasons, levels of APs in sediments should be controlled.

To date, different methods have been proposed for the determination of APs in soil [7,8], sludge [9,10] and sediments [3,11–15]. All of them involved a multi-step process that included an extraction technique, clean-up and a pre-concentration step prior to analysis because of the complexity of these matrices. Consequently, lots of

[☆] Presented at the 30th International Symposium on Chromatography (ISC 2014), Salzburg, Austria, 14–18 September 2014.

^{*} Corresponding author. Tel.: +34 981 167000; fax: +34 981 167065.

E-mail address: smuniat@udc.es (S. Muniategui-Lorenzo).

reagents (including toxic solvents and sorbents), time and energy were consumed, and in some cases, an important amount of waste was generated.

According to Green Chemistry principles proposed by Anastas in 1998 [16], *Green Analytical Chemistry* was suggested by Namiéśnik 1 year later, in order to implement sustainable methodologies in routine analysis [17]. Since that time, a great interest in development and validation of analytical methods which complies this philosophy has dramatically grown. In fact, recent books and scientific publications are based on this topic [18–23]. In all of them, the replacement of reagents with another one less toxic and safer, the use of miniaturized techniques or avoiding the derivatization step are always recommended [19].

One of the greenest techniques used for the extraction of solid samples is pressurized hot water extraction (PHWE) which is based on the use of water as extraction solvent at temperatures above 100 °C and at pressure high enough to keep it in liquid state [24]. Water is non-toxic, non-flammable, cheap and easily available solvent and at these extremely conditions, has a permittivity similar to typical organic solvents. Consequently, it can dissolve a wide range of medium and low polarity analytes [25]. PHWE was previously applied to the analysis of PAHs [26], organochlorine pesticides [25], polyphenols [27], chlorobenzenes [28] and personal care products [29]. Nevertheless, to the best of our knowledge, no previous works about APs analysis could be found in the literature.

Meanwhile, PHWE extracts are usually dilute aqueous solutions and consequently, a concentration/extraction step before the analysis is needed. Different miniaturized and free-solvent techniques for the analysis of APs in aqueous samples were published by several authors [30–33]. Another alternative is miniaturized membrane assisted solvent extraction (MASE), recently proposed by Salgueiro-González et al. for the analysis of these compounds in water samples [34]. This technique is based on the diffusion of organic compounds dissolved in an aqueous sample through membrane bag into a small amount of solvents. Simplicity, sensitivity, easy handling and low cost are the main advantages of miniaturized MASE.

Because of the diversity of analytes, the complexity of the matrices and the large number of analytical parameters to be considered, the evaluation of the methods in context of Green Chemistry is very difficult [35]. Although the application of traditional Green Chemistry metrics in Green Analytical Chemistry is still limited, an analytical Eco-Scale was recently proposed by Galuszka et al. [19]. This approach is analogous to the Eco-Scale proposed by Van Aken et al. [36] for evaluating the greenness of organic synthesis. Briefly, our methodology is compared with another one which complies with the principles of Green Chemistry, called “ideal green analysis”. The analytical score is estimated according to the following equation:

$$\text{Analytical Eco-Scale score} = 100 - \text{total PP}$$

where 100 is the score of “ideal green analysis” and penalty points (PP) are assigned to the analytical procedure parameters (reagents, toxicity, energy and waste) when our method differs to the greenest one. The higher the score, the greener and more economical analysis is. Taking into account this fact, methods could be classified in excellent green analysis (>75), acceptable green analysis (between 50 and 75) and inadequate green analysis (<50).

The aim of this paper is the development and validation of a novel, accurate and sensitive analytical methodology for the determination of APs in sediment samples based on a pressurized hot water extraction (PHWE) followed by a miniaturized membrane assisted solvent extraction (MASE) and LC-ESI-MS/MS detection.

As far as we know, this is the first PHWE–MASE–LC–MS/MS method found in the literature for the analysis of these pollutants. The main advantages of the proposed method were simplicity, automaticity, fastness and reduction in the analysis time and the use reagents, according to the principles of Green Chemistry. Furthermore, the greenness assessment of the methodology (excellent green analysis) was demonstrated with the Analytical Eco-Scale approach and compared with other analytical methods previously reported. Finally, the feasibility and applicability of the methodology was satisfactorily demonstrated with the analysis of real samples. Because of the low method quantitation limits achieved and the low amount of sample employed (0.5 g of sediment) this method could be an important tool in monitoring programs, in order to research the fate and occurrence of APs and to control and ensure the good quality of aquatic environment.

2. Experimental

2.1. Chemicals and materials

NP technical mixture 94% purity ($\pm 1\%$ tolerance) and 4-*n*-NP 99.9% purity ($\pm 0.5\%$ tolerance) were from Riedel-de Haën (Seelze, Germany). 4-tOP 97% purity ($\pm 0.5\%$ tolerance) and 4-*n*-OP 99% purity ($\pm 0.5\%$ tolerance) were obtained from Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany). As surrogate standard, 4-*n*-nonylphenol-2,3,5,6- d_4 (NP- d_4) 99.3% was obtained from CDN Isotopes (Pointe-Claire, Canada). All standard solutions (1000, 10 and 1 mg L⁻¹) containing all the compounds were prepared in methanol (SPS grade) from Romil Ltd (Cambridge, United Kingdom) and stored at 4 °C.

For the extraction, *n*-Hexane for organic trace analysis (UniSolv®) was from Merck (Darmstadt, Germany) and methanol Super Purity was used. Octadecyl functionalised silica gel (C18) was purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). For the determination, methanol LC–MS PAI and ammonia (30%) for instrumental analysis were from Panreac (Barcelona, Spain). Ultrapure water was purified with a Direct 5 Milli Q system (Millipore, Bedford, MA, USA).

2.2. Sampling and pretreatment of sediment samples

Surface sediments (0–5 cm depth) were collected using Van-Veen Grab in different points of Galicia coast (NW of Spain). After that, sediment samples were frozen at –20 °C, then freeze-dried, homogenized and sieved through a 250 µm in the laboratory. Before PHWE–MASE–LC–MS/MS analysis, samples were stored in desiccators.

2.3. PHWE–MASE–LC–MS/MS methodology

A detailed scheme of the proposed analytical methodology can be seen in Fig. 1. Samples (0.5 g of freeze-dried sediment) were placed at the stainless steel cell (11 mL) sealed at both ends with glass-fiber filters (Ø 19.8 mm) from Whatman (Kent, UK). The extraction was carried out in an accelerated extraction solvent system ASE 200 instrument (Dionex, Sunnyvale, CA, USA).

Then, the PHWE extracts were re-extracted by means of the miniaturized MASE Gerstel device (Mülheim, Germany) consisting of a 20 mL glass vial with a membrane insert made of dense polypropylene (4-cm long with a wall thickness of a 0.03 mm and an internal diameter of 6 mm). The membrane bag is fixed to a metal funnel (using a Teflon ring) suspended in the opening of the glass vial. Finally, the vial is sealed with a metallic crimp cap. Then, the MASE device was shaken using an agitation plate Vibrax-VXR by IKA (Staufen, Germany). The extraction conditions were previously described by Salgueiro-González et al. [34]. After extraction, the

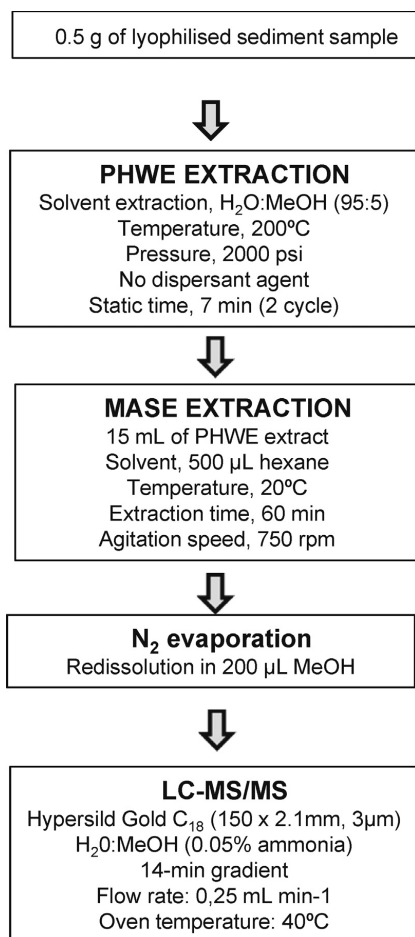


Fig. 1. Scheme of the PHWE-MASE-LC-MS/MS procedure.

organic solvent was manually collected and transferred into a 2 mL amber sampler vial. The extracts were evaporated to dryness under nitrogen stream and reconstituted in 200 µL of methanol.

Finally, LC-MS/MS determination was performed with an Agilent HP-1200 Series LC system coupled to a mass spectrometer with a triple quadrupole detector API 3200 of Applied Biosystems (Carlsbad, CA, USA) and an APCI/ESI source. The LC-MS/MS protocol was previously optimized and described in Salgueiro-González et al. [30].

2.4. QA/QC

To achieve high sensitivity and selectivity, multiple-reaction monitoring (MRM) was chosen as a data acquisition mode. According to the Decision 2002/657/EC [37], four identification points (one precursor ion and two products ions) were selected. Moreover, MRM ratio (relation between the two MRM transitions) was also used as a criterion for the identification of the compounds. For quantitation, surrogate standard NP-d₄ was used in order to correct matrix effect. All these parameters were shown in Table 1.

Table 1

Parent and fragment ions, retention times and MRM ratio for each compound.

Analyte	t_R (min)	Precursor ion (m/z)	Product ions (m/z)	MRM ratio ^b
4-tOP	10.62 ± 0.08	205 (M-H) ⁻	133 ^a 116	8.9 ± 0.3
NP	10.89 ± 0.09	219 (M-H) ⁻	133 ^a 116	5.8 ± 0.1
4-n-OP	10.99 ± 0.01	205 (M-H) ⁻	106 ^a –	–
4-n-NP	11.23 ± 0.07	219 (M-H) ⁻	106 ^a 119	22.4 ± 0.4
NP-d ₄	11.23 ± 0.07	223 (M-D) ⁻	109 ^a 129	14.4 ± 1.1

^a Quantitation ion.

^b Ratio and tolerances between quantification and confirmation MRM transitions according to Decision 2002/657/EC [37].

2.5. Blank contamination problems

Blank contamination problems in the analysis of these compounds at ultratrace levels were considered and minimized in previous works [38,39]. Consequently, ASE glass fiber filters were pre-cleaned by PLE extraction with methanol at 150 °C and 1500 psi during 5 min. Moreover, the dispersant agent proved in the optimization assays (C18) was also washed with the extraction solvent by sonication during 15 min and dried under nitrogen stream before the extraction procedure. Procedural blanks were frequently revised and kept under control for all compounds. Anyway, possible contribution of the analytes was subtracted from the samples in order to avoid overestimations in the results.

3. Results and discussion

3.1. Optimization of PHWE conditions

As it was commented before, the previous miniaturized MASE-LC-MS/MS methodology published by Salgueiro-González et al. [34] was now applied for the analysis of aqueous extracts obtained after the PHWE extraction of sediment samples. In all of the assays, a small amount of sediment sample (0.5 g freeze-dried) was spiked at level of 200 ng g⁻¹ of all the target compounds and placed into the stainless steel cell during 24 h at 4 °C [12]; in this way, real interactions between analytes and sample were supposed. The surrogate standard NP-d₄ (100 ng g⁻¹) was added before the MASE-LC-MS/MS analysis in order to compensate signal variations during these steps.

PHWE efficiency could be affected by many factors, which are briefly described below [24]. Temperature is one of the parameters mostly affects the extraction; high temperatures (>100 °C) increases the miscibility of analytes in the extraction solvent, improving the extraction process and consequently, this parameter should be included in the optimization step. To maintain solvent in a liquid state, pressure of 2000 psi was selected.

Although water is the solvent extraction of PHWE, a small volume of organic modifier could be used in order to improve the extraction efficiency. Bearing in mind the polarity of APs, methanol was chosen as organic modifier and the percentage of methanol in the solvent extraction was evaluated.

Another important parameter is the dispersant agent, which is frequently used to improve the interactions between sample and extraction solvent, as well to ensure the reproducibility of the extraction. In this assay, C18 was selected taking into account previous works [39].

Table 2
High and low values selected in the Plackett–Burman design.

Factors	Minimum value	Maximum value
A Temperature (°C)	100	200
B Number of cycles	1	2
C Dispersant agent C18	0	1
D Static time (min)	5	15
E MeOH in extraction solvent (%)	0	15
F Dummy factor 1	–1	1
G Dummy factor 2	–1	1

An exhaustive study should be carried out to consider all these parameters. According to Green Chemistry principles and in order to reduce the high number of assays carried out in a univariate optimization, an experimental design Plackett–Burman $2^7 \times 3/32$ with five experimental factors was performed using the statistical program Statgraphics Plus 4.0 routine for Windows (Statgraphics Graphics Corporation, STSC, USA). All the experiments were done in triplicate.

The selected experimental factors were temperature, number of cycles, dispersant agent (with 1.5 g of C18 and without C18), static time and percentage of methanol added to the solvent extraction. Furthermore, and to reach the orthogonality conditions, the introduction of two dummy factors was necessary; dummies have no influence in the analysis and are used to determine system errors of the experiments. High and low values for each factor (Table 2) were selected considering our system knowledge and previous experience.

Once these experiments were carried out, the analysis of the results was realized via standardized ($P=95.0\%$) main effect Pareto charts. Fig. 2 showed first order Pareto charts obtained for all the target compounds. As it can be seen, temperature was a significant factor for 4-*n*-NP (Fig. 2a) and is the main important parameter for the rest of APs. The other involved factors were not statistically significant. Values of these parameters were selected according to the sign of the estimated effect as well as other experimental conditions. In this manner, two cycles of 7 min were selected; moreover, the use of dispersant agent was discarded and a small percentage of methanol in the extraction solvent (5%) was selected to reduce

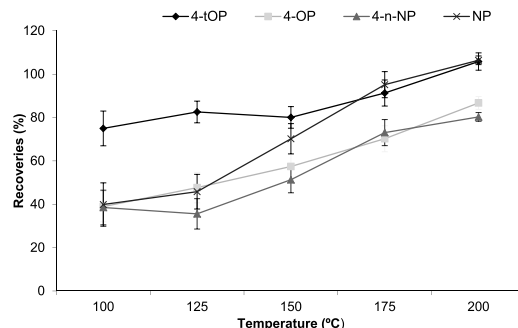


Fig. 3. Effect of temperature in the PHWE procedure ($n=3$).

the amount of hazard reagents, according to the Green Analytical Chemistry. Two-factor interaction Pareto Chart ($P=95.0\%$) was also taken into account; nevertheless, no interactions between variables were observed.

Because of the important influence of temperature in the extraction efficiency, a univariate optimization was performed later. Temperatures ranged from 100 to 200 °C were studied (Fig. 3). As expected, recoveries increased and standard deviation decreased with higher temperature. Thus, the maximum temperature (200 °C) was selected for the PHWE extraction.

Finally, a MRM chromatogram of a spiked sediment sample (200 ng g⁻¹ concentration level of all compounds and 100 ng g⁻¹ of surrogate standard) obtained with this analytical methodology was shown in Fig. 4a.

3.2. Study of matrix effect

Matrix constituent which coelutes with the target analytes can either suppress or enhance signal response in the LC–ESI–MS/MS, modifying the ionization efficiency of the electrospray interface [40]. This phenomenon, called *matrix effect* (ME), is very common in complex matrices and rich samples such as sediments. ME

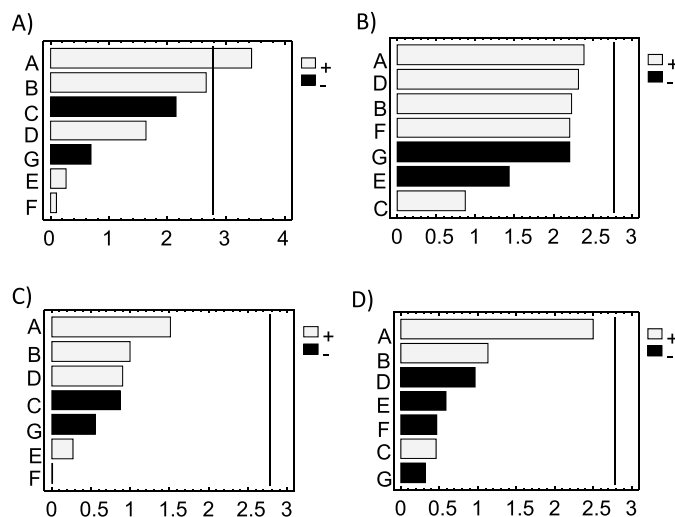


Fig. 2. Standardized Pareto chart obtained for (A) 4-*n*-NP, (B) NP, (C) 4-*n*-OP and (D) 4-*t*-OP. The studied factors were: A, temperature (°C); B, number of cycles; C, dispersant agent; D, static time (min); E, percentage of organic modifier in the extraction solvent (%); F, dummy; G, dummy. Scale in the x-axis is the standardized effect for each factor.

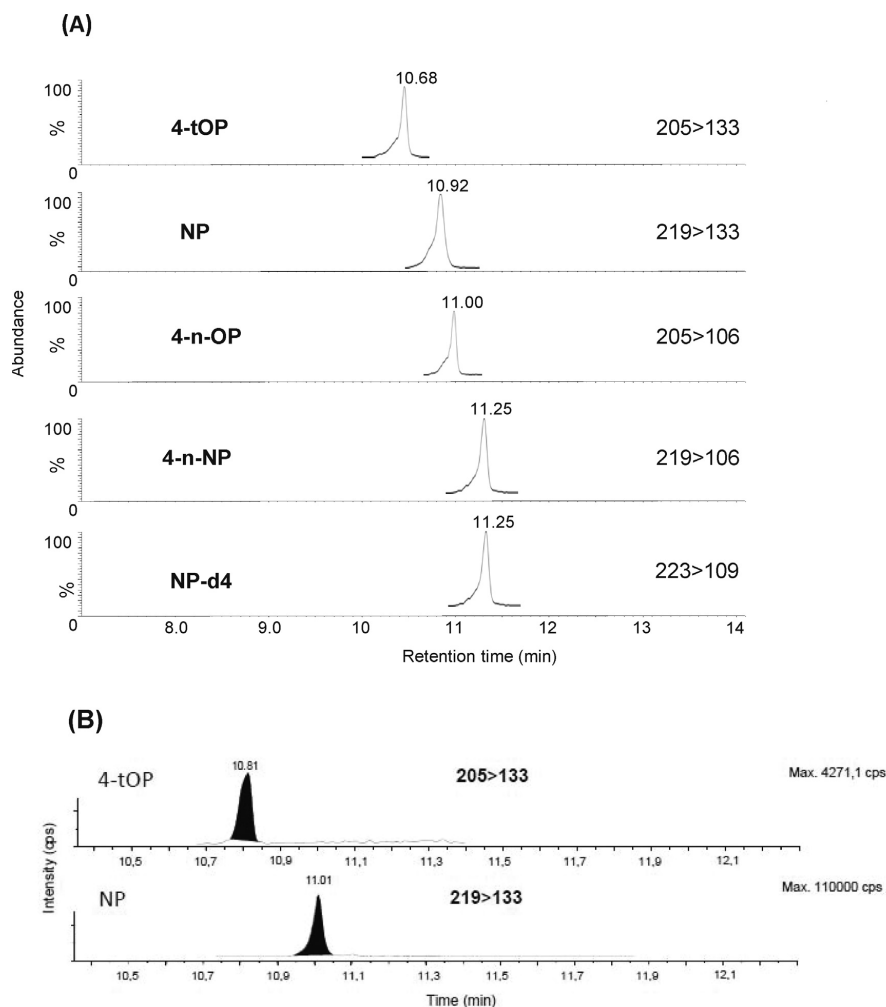


Fig. 4. MRM chromatograms corresponding to the analysis of (A) a spiked sediment sample (200 ng g^{-1} concentration level of all compounds and 100 ng g^{-1} of surrogate standard) and (B) a positive sediment sample (M5) obtained with the proposed analytical methodology.

could affect accuracy and reproducibility; consequently, it should be studied [41].

The MS/MS areas obtained when a standard solution in methanol (A_s) is injected in the LC-MS ($200 \mu\text{g L}^{-1}$ of each compounds) was compared to the peak areas belong to a spiked sediment sample (A_{mss}) at the same level of concentration and the peak areas measured for a non-spiked sample extract (A_{ms}), according to the following equation:

$$\text{ME}(\%) = \frac{(A_{\text{mss}} - A_{\text{ms}}) * 100}{A_s}$$

ME should be equal to 100% in absence of matrix effect. However, suppression ion gives a percentage inferior to 100% and enhancement a superior one. Obtained results showed ME lower than 50% in all cases which demonstrate moderate signal suppression due to the sediments constituents.

Surrogate standards (added to sediment samples) were used to compensate matrix effect and satisfactory results (recoveries between 87 and 106%) were obtained for all compounds. In this way, the analytical methodology was simplified, reducing the number of analysis (in comparison with standard addition), the analysis time per sample and the solvent consumption which means that PHWE-MASE method is more environmental friendly (Green Chemistry principles).

3.3. Quality assurance/quality control

Quality assurance and quality control systems are necessary to ensure the reliable of analytical results [42]. Thus, an exhaustive method validation and the estimation of analytical measurement uncertainty were carried out.

Due to the fact that certificated reference materials are not available for these compounds in sediments, the method

Table 3

Linearity, recovery, precision, method detection limit (MDL) and method quantitation limit (MQL) of target compounds in sediment samples with PHWE–MASE–LC–MS/MS.

Analyte	r^2	Concentration in sample \pm uncertainty ^a (ng g ⁻¹)	Accuracy (%)	Precision (%)		Experimental limits	
			Recovery (n = 6)	Repeatability (n = 6)	Intermediate precision (n = 8)	MDL (ng g ⁻¹)	MQL (ng g ⁻¹)
4-tOP	0.9998	50 \pm 10	103	6	8	0.030	0.077
		500 \pm 101	97	4	6		
4-n-OP	0.9999	50 \pm 10	92	3	6	0.026	0.064
		500 \pm 101	95	2	5		
4-n-NP	0.9999	50 \pm 10	93	3	5	0.024	0.061
		500 \pm 101	98	1	4		
NP	0.9996	50 \pm 10	102	7	9	0.600	1.70
		500 \pm 101	99	5	7		

^a Expanded uncertainty (U) about the mean with coverage factor 2 (95% of confidence).

validation was carried out using spiked samples and adding the surrogate standard (NP-d₄) to the sediment samples (before PHWE–MASE–LC–MS/MS). The figures of merit of the proposed analytical methodology (linearity range, sensitivity, accuracy, precision and uncertainty) were evaluated and showed in Table 3.

Linearity ($r > 0.9995$) was evaluated between 0.005 and 2500 ng g⁻¹ using seven calibration points ($n = 2$). The response was linear between the MQL and 1000 ng g⁻¹ for all compounds.

Precision and accuracy were determined at two levels of concentration distributed over the linear range (50 and 500 ng g⁻¹ in sediment samples). To evaluate accuracy, analytical recoveries of spiked samples were calculated taking into account the blank contributions. Mean recoveries ($n = 6$) ranged from 92 to 103% for all concentrations and all compounds. Repeatability and intermediate precision were calculated as RSD of concentrations, using six replicates analyzed the same day and the same analyst and equipment and eight replicates with the proposed method during different days along 2 weeks and the same analyst and equipment, respectively. In all cases, the repeatability and the intermediate precision of the method were satisfactory, with RSD < 9%.

The method detection limit (MDL) and method quantitation limit (MQL) were estimated as $X_b + 3SD_b$ (X_b : average and SD_b : standard deviation of the ten blank samples) and $X_b + 10SD_b$ respectively. These values were shown in Table 3 and ranged from 0.061 (4-n-NP) to 1.7 ng g⁻¹ (NP).

Measurement uncertainty of the analytical method was also estimated on the basis of in-house validation data according to EURACHEM/CITAC guide and other reviews found in the literature [42], for all compounds at two spiking levels [34].

The main sources of uncertainty were identified and quantified and combined uncertainty (u_c) was calculated as follows:

$$u_c(y) = \sqrt{u_1^2 + u_2^2 + u_3^2 + u_4^2 + u_5^2}$$

where the uncertainties associated with the spiked sample (u_1), precision (u_2), accuracy (u_3), analyte concentration (u_4) and calibration (u_5) were taken into account. The expanded uncertainty (U_{exp}) was estimated using the coverage factor (k) as 2 for a level of confidence of 95%.

$$U_{exp} = k * u_c$$

Due to the fact that validation was carried out using spiked samples (certificate reference materials were not available), the preparation of the standards and the concentration spiked in sample (C_{sample}) had to be considered. The uncertainty associated with the spiked sample (u_1) was calculated considering the contribution of the following factors: standards, pipettes, flask and balance.

$$u_1 = C_{sample} * \sqrt{\left(\frac{S_{standard}}{C_{standard}}\right)^2 + \left(\frac{S_{pipette}}{V_{pipette}}\right)^2 + \left(\frac{S_{flask}}{V_{flask}}\right)^2 + \left(\frac{S_{balance}}{m_{standard}}\right)^2}$$

The uncertainty associated with the precision (u_2) was expressed as a relative standard deviation obtained from the intermediate precision ($N = 10$).

$$u_2 = \frac{S_{intprec}}{\sqrt{N}}$$

Uncertainty associated with accuracy (u_3) was also evaluated. At first, a Student's t -test was used to determine whether the mean experimental recovery (X) was significantly different from the theoretical spiked value (μ) of concentration, according to the equation:

$$u_3 = \frac{S_{rec}}{\sqrt{N}}$$

$$t_{exp} = \frac{|X - \mu|}{u_3}$$

The t_{exp} values were compared with the two-tailed theoretical value ($n - 1$ degrees of freedom at 95% of confidence, where n is the number of replicates used to estimate recoveries). If these values are higher or equal than the theoretical value ($t_{5,95\%}$), experimental mean is significantly different from the theoretical spiked value, so the uncertainty associated to the accuracy (u_3) should be taken into account. The t_{exp} values were lower than $t_{5,95\%}$ (2.77) in all cases; therefore, this uncertainty was not considered.

The value of uncertainty associated with the analyte concentration (u_4) may be presented as ratio between limit of detection (MDL) and the studied concentration (C_{det}):

$$u_4 = \frac{MDL}{C_{det}}$$

Finally, the uncertainty associated with the calibration (u_5) can be calculated as the uncertainty as the response factor (RRF), according the following equation where N is the number of repetitions:

$$u_5 = \frac{S_{RRF}}{\sqrt{N}}$$

Table 4 shows all values of these individual uncertainties, the uncertainty combined and the relative expanded uncertainty (<21%) of target compounds in sediment samples at different concentrations.

3.4. Analytical Eco-Scale score for PHWE–MASE methodology: greenness assessment

The greenness of the proposed methodology was evaluated using the analytical Eco-Scale approach. Reagents and instruments were carefully considered in all procedural steps (sample preparation and instrumental analysis), as it can be seen in Table 5.

Table 4

Combined (u_c) and relative expanded uncertainties (U_{exp}) estimated for each analyte considering the uncertainty associated with the spiked samples (u_1), precision (u_2), accuracy (u_3), analyte concentration (u_4) and calibration (u_5).

Concentration in sample ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Analyte	u_1	u_2	u_3	u_4	u_5	u_c	U_{exp} (%) ^a
50	4-tOP	5.0	1.3	–	3.0E–4	1.1E–2	5.1	20
	4-n-OP	5.0	0.9	–	2.6E–4	1.0E–2	5.0	20
	4-n-NP	5.0	1.3	–	2.4E–4	1.9E–2	5.1	20
	NP	5.0	1.8	–	6.0E–4	3.5E–2	5.3	21
500	4-tOP	50	11	–	3.0E–5	1.1E–2	50	20
	4-n-OP	50	9.1	–	2.8E–5	1.0E–2	50	20
	4-n-NP	50	11	–	2.4E–5	1.9E–2	50	20
	NP	50	9.0	–	6.0E–5	3.5E–2	50	20

^a Expanded uncertainty (U) about the mean with coverage factor 2 (95% of confidence).

For reagents, both amount and hazard (physical, environmental, health) were described as sub-penalty points (sub-PP); in this case, the PP corresponds to the product of these two analytical parameters (amount sub-PP \times hazard sub-PP). Meanwhile, energy, occupational hazard and waste were assigned as sub-PPs for instruments; the PP was equal to the addition of all values of these sub-PPs.

The most important penalty points (PP) were the hazard reagents such as n-hexane or ammonia (30%); however, these chemicals were employed in very small volumes (<1 mL) and no greenness alternatives were possible. Furthermore, although instruments consumed energy, no occupational hazard was found in extraction and determination. Moreover, no waste was generated in any step of the analytical procedure. The obtained analytical Eco-Scale score (100 – total PP) was slightly higher than 75, which means that excellent green analysis could be carried out with the proposed methodology.

3.5. Comparison to previously reported methods

A state of the art of analytical methods for the analysis of APs in sediments was shown in Table 6. As it can be seen, the proposed methodology (PHWE–MASE–LC–MS/MS) has important improvements in comparison with previous reported methods. These advantages are commented in detail in the following lines.

Firstly, the analytical procedure was optimized and exhaustively validated for four APs, including both linear and branched isomers.

Although almost all works only considered branched isomers, the toxicity and presence in the environment of linear isomers were demonstrated.

The selection of extraction technique is one of the most critical point. Classic extraction techniques such as Soxhlet extraction [3,11] and sonication [12–14] were commonly employed because of their simplicity and the low cost of the equipment needed. Recently, pressurized liquid extraction (PLE) [1,15,43,46] has been developed to reduce analysis time and solvent consumption. However, PHWE improves these advantages due to the fact that water is non-toxic, non-flammable, cheap and easily available solvent.

Regarding the clean-up step, off line solid phase extraction using silica gel [3,44] and Florisil [11–13] were typically applied. Nevertheless, this procedure increased the analysis time and could produce blank contamination problems. One alternative based on a simultaneous PLE extraction and clean-up (in cell clean-up), which allow the reduction of solvents [46] was carried out. In comparison with these techniques, greener ones (microextraction techniques) could be used when PHWE is employed because of the obtained aqueous extracts. One of them is miniaturized MASE which largely reduces the volume of toxic solvents (<1 mL), consumes less time and no waste are generated.

For the analysis process, gas chromatography mass spectrometry (GC–MS) was the most common technique [1,3,8,12,13,44]. However, the derivatization step to transform these compounds into volatile derivatives presents some disadvantages (such as more time for analysis or losses of analytes) and, consequently, greater

Table 5

Analytical Eco-Scale of the PHWE–MASE–LC–MS/MS. Penalty points (PP) calculation.

Procedural step	Analytical parameters		Considerations	Sub-PP	PP
PHWE	Reagents	Methanol	Amount: <10 mL	1	1
			Hazard	1	
	Instruments	ASE	Energy > 1.5 kWh per sample	2	2
			Hazard	0	
Miniaturized MASE	Reagents	n-Hexane	Amount <10 mL	1	8
			Hazard	8	
	Instruments	Agitator	Energy <1.5 kWh per sample	1	1
			Hazard	0	
Evaporation	Instruments	Nitrogen stream	Energy <0.1 kWh per sample	0	0
			Hazard	0	
	Reagents	Methanol	Amount > 100 mL	3	3
		Ammonia (30%)	Amount <10 mL	1	
LC–MS/MS analysis	Instruments	LC–MS/MS	Energy > 1.5 kWh per sample	2	3
			Hazard	0	
	Reagents	Methanol	Amount > 100 mL	3	3
		Ammonia (30%)	Amount <10 mL	1	
	Instruments	LC–MS/MS	Energy > 1.5 kWh per sample	2	3
			Hazard	0	
	Reagents	Methanol	Amount > 100 mL	3	3
		Ammonia (30%)	Amount <10 mL	1	
	Instruments	LC–MS/MS	Energy > 1.5 kWh per sample	2	3
			Hazard	0	
	Reagents	Methanol	Amount > 100 mL	3	3
		Ammonia (30%)	Amount <10 mL	1	

Total penalty points: 24.

Analytical Eco-Scale total score: 76.

ASE, assisted solvent extractor; MASE, membrane assisted solvent extraction; LC–MS/MS, liquid chromatography tandem mass spectrometry; PHWE, pressurized hot water extraction.

Table 6
Analytical methodologies for the analysis of APs in sediments found in the literature. Metrological parameters and evaluation of greener assessment.

Analyzed compounds	Amount of sample (g)	Extraction technique	Extraction parameters	Determination	Recovery (RSD %)	MDL/MQL (ng g ⁻¹)	Analytical Eco-Scale	Reference
4-tOP, 4-n-OP, 4-n-NP, NP	0.5 g	PLE–MASE	Water:methanol (95:5); temperature, 200 °C; static time 7 min 500 µL hexane, 60 min, 750 rpm	LC–MS/MS	92–103 (<9%)	MQL: 0.061 (4-n-NP)–1.7 (NP)	>75	This work
NP	2 g	PLE	Acetone:MeOH (50:50 v/v) Temperature 50 °C Static time, 3 × 1 min	HPLC–UV–Vis	84 (6)	MQL: 15	50–70	[43]
4-tOP, NP	1 g	US–SBSE	1) MeOH, 30 min 2) 6 h, 900 rpm	GC–MS derivatization: acetic acid and K ₂ CO ₃	85–89 (12%)	MDL: 0.2 (4-tOP)–0.3 (NP)	50–70	[8]
4-tOP, NP	NM	US–SPE	DCM:MeOH (7/3 v/v) Toluene:MeOH (1:6) Temperature 100 °C Static time, 5 min	LC–MS/MS	NM	NM	50–70	[14]
4-n-NP, NP	5 g	Soxhlet–SPE	DCM, 30 mL, 20 min LC–SI cartridges	GC–MS derivatization: BSTFA (1% TMCs) and pyridine	97–102 (9)	MQL: 0.33 (4-n-NP) and 0.5 (NP)	<50	[44]
NP	5 g	Digestion–LLE–SPE	1) Digestion in methanolic KOH 2) Hexane 3) Silica gel clean-up	GC–MS derivatization: acetic acid and pyridine	NM	NM	<50	[45]
4-tOP, NP	10 g	Soxhlet–SPE	DCM, 270 mL, 10 h Silica gel	GC–MS	NM	NM	<50	[3]
NP	20 g	US–SPE	Acetone:MeOH (80:20 v/v), 2 h	LC–MS/MS	84 (6)	NM	50–70	[13]
4-tOP, NP	1 g	US–SPE	DCM:hexane (10 min) Hexane:acetone (10 min)	GC–MS/MS	84–107 (11)	MQL: 38 (4-tOP)–48 (NP)	50–70	[12]
4-tOP, NP	2.5 g	Soxhlet–SPE	Florisil DCM, 20 h	HPLC–FLD	NM	MDL: <0.2	<50	[11]
4-tOP, NP	10 g	Soxhlet	DCM, 48 h	GC–MS	NM	NM	<50	[1]
4-tOP, NP	10 g (+10 g sand)	PLE	Toluene:MeOH (1:6) Temperature 100 °C Static time, 5 min		NM	NM	<50	
4-tOP, 4-n-OP, 4-n-NP, NP	0.5 g	SPLE	Methanol (100%); temperature, 100 °C, static time, 5 min Basic alumina, 2 g	LC–MS/MS	94–100 (<5%)	MQL: 0.17 (4-n-NP)–4.01 (NP)	50–70	[46]
4-tOP, NP	5 g (+Na ₂ SO ₄)	PLE–SPE	Acetone:MeOH (1:1 v/v) Temperature 50 °C Static time, 5 min (2 cycles) C18 cartridges	LC–MS	77–89 (11%)	MDL: 1	50–70	[15]

BSTFA, N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide; DCM, dichloromethane; FLD, fluorescence detection; GC, gas chromatography; HPLC, high performance liquid chromatography; LC, liquid chromatography; LLE, liquid liquid extraction; MDL, method detection limit; MeOH, methanol; MS, mass spectrometry; MQL, method quantitation limit; NM, not mentioned; PLE, pressurized liquid extraction; RSD, relative standard deviation; SBSE, stir bar sorption extraction; SPE, solid phase extraction; SPLE, selective pressurized liquid extraction; TMCs, trimethylchlorosilane; US, sonication; UV–Vis, ultraviolet–Visible.

Table 7Concentrations (ng g⁻¹ dw) of APs in sediment samples collected in Galicia coast (NW Spain). Comparison with literature data.

Location	Concentration APs (ng g ⁻¹ dw) ± U _{exp} ^a				Reference
	4-tOP	4-n-OP	4-n-NP	NP	
Galicia coast (M1)	18.7 ± 3.8	n.d.	n.d.	81.7 ± 17.2	This study
Galicia coast (M2)	10.7 ± 2.2	n.d.	n.d.	303 ± 61	
Galicia coast (M3)	9.3 ± 1.9	n.d.	n.d.	453 ± 91	
Galicia coast (M4)	20.5 ± 4.1	n.d.	n.d.	190 ± 38	
Galicia coast (M5)	22.0 ± 4.5	n.d.	n.d.	460 ± 92	
Ireland	N.A.	N.A.	N.A.	<15–1560	[43]
Mediterranean coast	441–450	N.A.	N.A.	880–901	[8]
Anzali Wetland (Iran)	10–4260	N.A.	N.A.	50–29,000	[3]
Venice (Italy)	N.A.	N.A.	N.A.	47–192	[13]
Pearl River (China)	<1–463	N.A.	N.A.	31–2885	[1]
San Francisco Bay (USA)	N.A.	N.A.	N.A.	21.5–86.3	[50]
Pearl River (China)	1–18	N.A.	N.A.	59–571	[51]
Portugal	1.8–8.6	N.A.	N.A.	<1–1170	[15]

n.d., not detected; N.A., not analyzed.

^a Expanded uncertainty (U) about the mean with coverage factor 2 (95% of confidence).

error [47]. Hence, liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC–MS) is employed as a greener alternative technique.

The obtained recoveries were better than the reported in literature, especially in the case of NP because of blank contamination problems. Furthermore, low method quantitation limits (MQL) were achieved using only 0.5 g of sediment sample.

Concerning of the greener assessment, the obtained Eco-Scale score 76 is higher in comparison with the scores calculated for almost all previous methodologies (see Table 6). These scores were broadly estimated taking into account the main steps of the analytical procedures. Although 50% of previous methodologies symbolized an acceptable green analysis, the other 50% represented an inadequate green analysis. This fact shows the need of encouraging Green Analytical Chemistry.

Finally, a small amount of sample (0.5 g of dried sediment) is only necessary; consequently, it could be a useful tool in monitoring programs to control the presence of these compounds in aquatic environment.

3.6. Application to sediment samples

As an example, and in order to demonstrate the feasibility and applicability of the proposed method, sediment samples from Galicia coast (NW Spain) were analyzed.

The obtained results (Table 7) showed that linear isomers (4-n-OP and 4-n-NP) were not found in any sample whereas branched isomers (4-tOP and NP) were measured in all of them. Concentrations of 4-tOP ranged from 9.3 to 22.0 ng g⁻¹ dw whereas NP varied between 81.7 and 460 ng g⁻¹ dw. The MRM chromatogram of one positive sample (M5) was shown in Fig. 4b.

These concentrations are similar to the levels measured in German rivers and estuaries [48] and whereas higher concentrations (more than ten times) were shown in Great lakes (Canada) [49] or Masan Bay (Korea) [50]. All reported concentrations were included in Table 7.

4. Conclusions

For the first time, a novel, simple and green analytical methodology based on a PHWE–MASE–LC–MS/MS for the analysis of linear and branched APs in sediments at ultratrace levels were developed and exhaustively validated, including the estimation of measurement uncertainty.

The sensitivity and selectivity of the method allow the achievement of low method quantitation limits using a small amount of sample (only 0.5 g of sediment) which facilitates sampling, transport and storage. Furthermore, satisfactory precision and accuracy

were obtained. Other advantages are fastness, simplicity, easy handling and partial automaticity. The greenness assessment of the method was carried out by the Analytical Eco-Scale approach. The calculated score showed that excellent green analysis could be done. In comparison with the other methodologies found in the literature for the analysis of APs in sediments, the proposed analytical method is one of the greenest one, employing miniaturized techniques and minimizing the use of reagents, waste generation and analysis time. Consequently, the necessity of sustainable alternative methods was evidenced and Green Analytical Chemistry principles should be further applied.

Finally, the applicability of the proposed method to sediment samples proved its practicability. NP and 4-tOP were measured in all samples which show the ubiquity of these compounds. For all these reasons, this method has demonstrated feasibility to be incorporated in monitoring programs in order to obtain a database of these compounds in environment and control the good quality of the aquatic environment.

Acknowledgements

This work has been financially supported by Program of Consolidation and Structuring of Units of Competitive Investigation of the University System of Galicia (Xunta de Galicia) potentially cofinanced by ERDF in the frame of the operative Program of Galicia 2007–2013 (Ref GRC2013-047) and Spanish Ministry of Economy and Competitiveness and cofinanced by ERDF (CTM2013-48194-C3-2-R). N. Salgueiro-González acknowledges Xunta de Galicia and Campus do Mar International Campus of Excellence for Ph.D. grant and G. Fernández-Martínez (SAI-UDC) by the LC–MS/MS support.

References

- [1] J. Gong, L. Xu, Y. Yang, D.Y. Chen, Y. Ran, Sequential ASE extraction of alkylphenols from sediments: occurrence and environmental implications, *J. Hazards Mater.* 192 (2011) 643.
- [2] Community strategy for endocrine disruptors – a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife, COM 706 (1999) 1999.
- [3] S. Mortazavi, A.R. Bakhtiari, A.E. Sari, N. Bahramifar, F. Rahbarizade, Phenolic endocrine disrupting chemicals (EDCs) in Anzali Wetland, Iran: elevated concentrations of 4-nonylphenol, octylphenol and bisphenol A, *Mar. Pollut. Bull.* 64 (2012) 1067.
- [4] Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council of 12 August 2013 Amending Directives 2000/60/EC as Regards Priority Substances in the Field of Water Policy, 2013.
- [5] Common Implementation Strategy for the Water Framework Directive (2000/60/EC), Guidance No.25 on Chemical Monitoring of Sediment and Biota under the Water Framework Directive, 2010.
- [6] H. Liu, K. Cui, F. Zeng, L. Chen, Y. Cheng, H. Li, S. Li, X. Zhou, F. Zhu, G. Ouyang, T. Luan, Z. Zeng, Occurrence and distribution of phthalate esters in riverine

- sediments from the Pearl River Delta region, South China, Mar. Pollut. Bull. 83 (2014) 358.
- [7] I. Jiménez-Díaz, O. Ballesteros, A. Zafra-Gómez, G. Crovetto, J.L. Vilchez, A. Navalón, C. Verge, J.A. deFerrer, New sample treatment for the determination of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates in agricultural soils, Chemosphere 80 (2010) 248.
 - [8] J. Llorca-Pórcel, M. Martínez-Parreño, E. Martínez-Soriano, I. Valor, Analysis of chlorophenols, bisphenol-A, 4-tert-octylphenol and 4-nonylphenols in soil by means of ultrasonic solvent extraction and stir bar sorptive extraction with in situ derivatisation, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 5955.
 - [9] V. Andreu, E. Ferrer, J.L. Rubio, G. Font, Y. Pico, Quantitative determination of octylphenol, nonylphenol, alkylphenol ethoxylates and alcohol ethoxylates by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-mass spectrometry in soils treated with sewage sludges, Sci. Total Environ. 378 (2007) 124.
 - [10] J.B. Baugros, C. Cren-Olive, B. Giroud, J.Y. Gauthier, P. Lanteri, M.F. Grenier-Loustalot, Optimisation of pressurized liquid extraction by experimental design for quantification of pesticides and alkyl phenols in sludge, suspended materials and atmospheric fallout by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 4941.
 - [11] K. Senthil Kumar, K.S. Sajwan, J.P. Richardson, K. Kannan, Contamination profiles of heavy metals, organochlorine pesticides, polycyclic aromatic hydrocarbons and alkylphenols in sediment and oyster collected from marsh/estuarine Savannah GA, USA, Mar. Pollut. Bull. 56 (2008) 136.
 - [12] J. Sánchez-Avila, M. Fernandez-Sanjuan, J. Vicente, S. Lacorte, Development of a multi-residue method for the determination of organic micropollutants in water, sediment and mussels using gas chromatography-tandem mass spectrometry, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 6799.
 - [13] G. Pojana, A. Gomiero, N. Jonkers, A. Marcomini, Natural and synthetic endocrine disrupting compounds (EDCs) in water, sediment and biota of a coastal lagoon, Environ. Int. 33 (2007) 929.
 - [14] E. Puy-Azumendi, M. Ortiz-Zarragoitia, M. Kuster, E. Martinez, M. Guillamin, C. Dominguez, T. Serrano, M.C. Barbero, M.L.d. Alda, J.M. Bayona, D. Barcelo, M.P. Cajaraville, An integrated study of endocrine disruptors in sediments and reproduction-related parameters in bivalve molluscs from the Biosphere's Reserve of Urdaibai (Bay of Biscay), Mar. Environ. Res. 69 (2010) 563.
 - [15] M. Petrovic, S. Lacorte, P. Viana, D. Barcelo, Pressurized liquid extraction followed by liquid chromatography-mass spectrometry for the determination of alkylphenolic compounds in river sediment, J. Chromatogr. A 959 (2002) 15.
 - [16] P.T. Anastas, J.C. Warner, Green Chemistry: Theory and Practice, 1998.
 - [17] J. Namiesnik, Pro-ecological education – chemical Faculty of the Technical University of Gdansk, Poland, Environ. Sci. Pollut. Res. 6 (1999) 243.
 - [18] M. de la Guardia, S. Armentera, Green Analytical Chemistry: Theory and Practice, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 2011.
 - [19] A. Galuszka, P. Konieczka, Z.M. Migaszewski, J. Namiesnik, Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures, Trends Anal. Chem. 37 (2012) 61.
 - [20] R. Hartman, R. Helmy, M. Al-Sayah, C.J. Welch, Analytical method volume intensity (AMVI): a green chemistry metric for HPLC methodology in the pharmaceutical industry, Green Chem. 13 (2011) 934.
 - [21] A. Spietelun, L. Marcinkowski, M. de la Guardia, J. Namiesnik, Recent developments and future trends in solid phase microextraction techniques towards green analytical chemistry, J. Chromatogr. A 1321 (2013) 1.
 - [22] M. de la Guardia, S. Garrigues, Handbook of Green Analytical Chemistry, 2012.
 - [23] S. Armenta, S. Garrigues, M. de la Guardia, Green analytical chemistry, Trends Anal. Chem. 27 (2008) 497.
 - [24] C.C. Teo, S.N. Tan, J.W.H. Yong, C.S. Hew, E.S. Ong, Pressurized hot water extraction (PHWE), J. Chromatogr. A 1217 (2010) 2484.
 - [25] E. Concha-Grana, V. Fernandez-Gonzalez, G. Grueiro-Noche, S. Muniategui-Lorenzo, P. Lopez-Mahia, E. Fernandez-Fernandez, D. Prada-Rodriguez, Development of an environmental friendly method for the analysis of organochlorine pesticides in sediments, Chemosphere 79 (2010) 698.
 - [26] V. Fernandez-Gonzalez, E. Concha-Grana, S. Muniategui-Lorenzo, P. Lopez-Mahia, D. Prada-Rodriguez, Pressurized hot water extraction coupled to solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments, J. Chromatogr. A 1196 (2008) 65.
 - [27] J. Liu, M. Sandahl, P.J.R. Sjöberg, C. Turner, Pressurized hot water extraction in continuous flow mode for thermolabile compounds: extraction of polyphenols in red onions, Anal. Bioanal. Chem. 406 (2014) 441.
 - [28] Y. Lu, Y. Zhu, Determination of chlorobenzenes in textiles by pressurized hot water extraction followed by vortex-assisted liquid-liquid microextraction and gas chromatography-mass spectrometry, J. Chromatogr. A 1319 (2013) 27.
 - [29] M.G. Pintado-Herrera, E. Gonzalez-Mazo, P.A. Lara-Martin, Environmentally friendly analysis of emerging contaminants by pressurized hot water extraction-stir bar sorptive extraction-derivatization and gas chromatography-mass spectrometry, Anal. Bioanal. Chem. 405 (2013) 401.
 - [30] N. Salgueiro-González, E. Concha-Graña, I. Turnes-Carou, S. Muniategui-Lorenzo, P. López-Mahía, D. Prada-Rodríguez, Determination of alkylphenols and bisphenol A in seawater samples by dispersive liquid-liquid microextraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry for compliance with Environmental Quality Standards (Directive 2008/105/EC), J. Chromatogr. A 1223 (2012) 1.
 - [31] M.K.R. Mudi, R. Jain, R. Singh, Application of ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction and automated in-port silylation for the simultaneous determination of phenolic endocrine disruptor chemicals in water samples by gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry, Anal. Methods 6 (2014) 1802.
 - [32] J.I. Cacho, N. Campillo, P. Vinas, M. Hernandez-Cordoba, Determination of alkylphenols and phthalate esters in vegetables and migration studies from their packages by means of stir bar sorptive extraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry, J. Chromatogr. A 1241 (2012) 21.
 - [33] E. Bizkarguenaga, O. Ros, A. Iparraguirre, P. Navarro, A. Vallejo, A. Usobiaga, O. Zuloaga, Solid-phase extraction combined with large volume injection-programmable temperature vaporization-gas chromatography-mass spectrometry for the multiresidue determination of priority and emerging organic pollutants in wastewater, J. Chromatogr. A 1247 (2012) 104.
 - [34] N. Salgueiro-González, I. Turnes-Carou, S. Muniategui-Lorenzo, P. Lopez-Mahia, D. Prada-Rodriguez, Membrane assisted solvent extraction coupled with liquid chromatography tandem mass spectrometry applied to the analysis of alkylphenols in water samples, J. Chromatogr. A 1281 (2013) 46.
 - [35] M. Tobiszewski, S. Tsakovski, V. Simeonov, J. Namiesnik, Application of multivariate statistics in assessment of green analytical chemistry parameters of analytical methodologies, Green Chem. 15 (2013) 1615.
 - [36] K. Van Aken, L. Strekowski, L. Patiny, EcoScale, a semi-quantitative tool to select an organic preparation based on economical and ecological parameters, Beilstein J. Org. Chem. 2 (2006) 3.
 - [37] Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, 2002.
 - [38] N. Salgueiro-González, E. Concha-Graña, I. Turnes-Carou, S. Muniategui-Lorenzo, P. López-Mahía, D. Prada-Rodríguez, Blank and sample handling troubleshooting in ultratrace analysis of alkylphenols and bisphenol A by liquid chromatography tandem mass spectrometry, Talanta 101 (2012) 413.
 - [39] N. Salgueiro-González, I. Turnes-Carou, S. Muniategui-Lorenzo, P. Lopez-Mahia, D. Prada-Rodriguez, Fast and selective pressurized liquid extraction with simultaneous in cell clean up for the analysis of alkylphenols and bisphenol A in bivalve molluscs, J. Chromatogr. A 1270 (2012) 80.
 - [40] A. Furey, M. Moriarty, V. Bane, B. Kinsella, M. Lehan, Ion suppression; a critical review on causes, evaluation, prevention and applications, Talanta 115 (2013) 104.
 - [41] T. Benijts, R. Dams, W. Lambert, A. De Leenheer, Countering matrix effects in environmental liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry water analysis for endocrine disrupting chemicals, J. Chromatogr. A 1029 (2004) 153.
 - [42] P. Konieczka, J. Namiesnik, Estimating uncertainty in analytical procedures based on chromatographic techniques, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 882.
 - [43] A.M. Reid, C.A. Brougham, A.M. Fogarty, J.J. Roche, Accelerated solvent-based extraction and enrichment of selected plasticisers and 4-nonylphenol, and extraction of tin from organotin sources in sediments, sludges and leachate soils, Anal. Chim. Acta 634 (2009) 197.
 - [44] Y. Liu, Y.T. Guan, N.F.Y. Tam, T. Mizuno, H. Tsuno, W.P. Zhu, Influence of rainfall and basic water quality parameters on the distribution of endocrine-disrupting chemicals in coastal area, Water Air Soil Pollut. 209 (2010) 333.
 - [45] S.L. Klosterhaus, R. Grace, M.C. Hamilton, D. Yee, Method validation and reconnaissance of pharmaceuticals, personal care products, and alkylphenols in surface waters, sediments, and mussels in an urban estuary, Environ. Int. 54 (2013) 92.
 - [46] N. Salgueiro-González, I. Turnes-Carou, S. Muniategui-Lorenzo, P. López-Mahía, D. Prada-Rodríguez, Analysis of Endocrine Disruptor Compounds in marine sediments by in cell clean-up pressurized liquid extraction-liquid chromatography tandem mass spectrometry, Anal. Chim. Acta 852 (2014) 112.
 - [47] T. Vega Morales, M.E. Torres Padron, Z. Sosa Ferrera, J.J. Santana Rodriguez, Determination of alkylphenol ethoxylates and their degradation products in liquid and solid samples, Trends Anal. Chem. 28 (2009) 1186.
 - [48] U. Bolz, H. Hagenmaier, W. Korner, Phenolic xenoestrogens in surface water, sediments, and sewage sludge from Baden-Württemberg, south-west Germany, Environ. Pollut. 115 (2001) 291.
 - [49] D.T. Bennie, C.A. Sullivan, H.B. Lee, T.E. Peart, R.J. Maguire, Occurrence of alkylphenols and alkylphenol mono- and diethoxylates in natural waters of the Laurentian Great Lakes basin and the upper St Lawrence River, Sci. Total Environ. 193 (1997) 263.
 - [50] D. Li, M. Dong, W.J. Shim, U.H. Yim, S.H. Hong, N. Kannan, Distribution characteristics of nonylphenolic chemicals in Masan Bay environments, Korea, Chemosphere 71 (2008) 1162.
 - [51] B. Chen, B.X. Mai, J.C. Duan, X.J. Luo, Q.S. Yang, G.Y. Sheng, J.M. Fu, Concentrations of alkylphenols in sediments from the Pearl River estuary and South China Sea, South China, Mar. Pollut. Bull. 50 (2005) 993.

ANEXO VI

Fast and selective pressurized liquid extraction with simultaneous
in cell clean up for the analysis of alkylphenols and bisphenol A in
bivalve molluscs

J Chromatogr A, 1270 (2012) 80-87



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Chromatography A

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chroma

Fast and selective pressurized liquid extraction with simultaneous in cell clean up for the analysis of alkylphenols and bisphenol A in bivalve molluscs

N. Salgueiro-González^a, I. Turnes-Carou^a, S. Muniategui-Lorenzo^{a,*}, P. López-Mahía^{a,b},
D. Prada-Rodríguez^{a,b}

^a Department of Analytical Chemistry, University of A Coruña, Campus da Zapateira, Rúa da Fraga 10, E-15008 A Coruña, Spain

^b University Institute of Environment, Pazo de Lóngora, Liáns, Oleiros, E-15179 A Coruña, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 September 2012

Received in revised form 7 November 2012

Accepted 8 November 2012

Available online 14 November 2012

Keywords:

Alkylphenols

Bisphenol A

Mussels

Selective pressurized liquid extraction

LC–ESI–MS/MS

Green Chemistry

ABSTRACT

A novel and green analytical methodology for the determination of alkylphenols (4-tert-octylphenol, 4-n-octylphenol, 4-n-nonylphenol, nonylphenol technical mixture) and bisphenol A in bivalve mollusc samples was developed and validated. The method was based on selective pressurized liquid extraction (SPLE) with a simultaneous in cell clean up combined with liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry in negative mode (LC–ESI–MS/MS). Quantitation was performed by standard addition curves in order to correct matrix effects. The analytical features of the method were satisfactory: relative recoveries varied between 80 and 107% and repeatability and intermediate precision were <20% for all compounds. Uncertainty assessment of measurement was estimated on the basis of an in-house validation according to EURACHEM/CITAC guide. Quantitation limits of the method (MQL) ranged between 0.34 (4-n-octylphenol) and 3.6 ng g^{−1} dry weight (nonylphenol). The main advantages of the method are sensitivity, selectivity, automaticity, low volumes of solvents required and low sample analysis time (according with the principles of Green Chemistry). The method was applied to the analysis of mussel samples of Galicia coast (NW of Spain). Nonylphenol and 4-tert-octylphenol were measured in all samples at concentrations between 9.3 and 372 ng g^{−1} dw. As an approach, the human daily intake of these compounds was estimated and no risk for human health was found.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Alkylphenols (APs) and bisphenol A (BPA) are well known endocrine disrupting compounds (EDCs) able to mimic or antagonize the female estrogens 17 β -estradiol [1]. Whereas APs are the most important non-ionic surfactants used in industrial applications, BPA is widely used in the production of polycarbonates, epoxy resins and flame retardants [2].

These ubiquitous environmental pollutants could enter into the aquatic ecosystem by direct industrial and wastewater treatment plants (WTP) discharges [3] and tend to deposit and concentrate in sediments, soils and biota because of their physical and chemical properties [4].

Due to their wide industrial applications and their behavior as endocrine disruptor compounds, European Union has included APs (specifically 4-tert-octylphenol and 4-nonylphenol) in the “list of 33 priority substances” in Water Framework Directive

2000/60/EC (WFD) [5]. Moreover, the Directive 2008/105/EC [6] sets the Environmental Quality Standards (EQS) for these compounds in water and include BPA in the Annex III as a future regulated substance in the “list of 33 priority substances”. This Directive also shows the need to set EQS for these compounds in sediments and/or biota in order to protect the aquatic environment. At this moment, limit values are not established for BPA and APs; however, a “concentration limit” for nonylphenol and 4-tert-octylphenol in seafood (8.7 mg kg^{−1} ww) has been estimated based on acute toxicity (risk assessment) and compiled in some European reports [7,8].

Specifically, the Marine Strategy Framework Directive (Directive 2008/56/EC) [9] establishes a community action to protect marine environment. To assess the achievement of a good environmental status, monitoring marine pollution programs are required.

Filtering organisms such as mussels and oysters are used in monitoring programs as bioindicators of pollution due to their capability to accumulate higher concentrations of contaminants (including transient pollution present in the water column) and the limited ability to metabolize them [10,11]. Furthermore, the

* Corresponding author. Tel.: +34 981 167000; fax: +34 981 167065.
E-mail address: smunia@udc.es (S. Muniategui-Lorenzo).

analysis of these organisms provides information about the fraction of environmental pollution which is bioavailable to aquatic organisms [12].

Otherwise, pollutants present in bivalve molluscs can affect human health by means of direct ingestion or their bioaccumulation along the food chain. In fact, seafood is one of the most important sources of human exposure of APs (around 70% of the whole diet intake [13]). In order to avoid possible damage of human health, values of tolerance daily intake (TDI) were established by different European organizations. For example, the Danish Institute of Safety and Toxicology proposed a TDI of 300 $\mu\text{g}/\text{day}$ (adult of 60 kg) for nonylphenol [13].

For all the reasons commented before, simple, fast, sensitive and selective analytical methodologies are required. For the analysis of APs and BPA from these matrices, extraction techniques such as soxhlet extraction [14,15], matrix solid phase dispersion (MSPD) [12,16,17], sonication [11,18,19], steam distillation [3] and microwave assisted extraction (MAE) [20] were employed. Nowadays, alternative techniques such as pressurized liquid extraction (PLE), which presents some advantages in terms of simplicity, automaticity or low analysis time, are also used [21].

However, significant volumes of toxic solvents (dichloromethane, acetone and hexane) are still used to carry out these analyses by PLE. Furthermore, an efficient clean-up to remove possible interferences is mandatory to avoid the presence of interfering substances, especially lipids, which can affect the sensitivity of the method and also degrade the HPLC columns [22]. Solid phase extraction (SPE) using neutral alumina, silica and/or florisil [11,18,23] and gel permeation chromatography (GPC) [24,25] are the most common purification techniques in the analysis of APs and BPA. In order to comply with the principles of Green Chemistry [26,27], to simplify the experimental procedure, reduce the analysis time, and also to avoid sources of contamination, analytical methods that combine extraction and purification of the extracts in the same step are recommended.

The determination of alkylphenols and bisphenol A is commonly performed by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC–MS) [23–25,28]. However, due to the polarity and the low volatility of these compounds, a derivatization step is frequently needed to avoid poor chromatographic peaks and obtain good precision [29]. Nowadays, the analysis of APs and BPA in environmental matrices is carried out by liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC–MS) [11,14,15] because of its inherent sensitivity and selectivity. Other advantages are the presence of new interfaces which allow the soft ionization of a wide range of substances and the no requirement of derivatization [30].

The aim of this work is the development and validation of a simple, fast and robust analytical methodology for the simultaneous determination of APs and BPA in bivalve mollusc samples based on a selective pressurized liquid extraction (SPLE) with a simultaneous and automatic in-cell clean up followed by the quantitation using LC–ESI–MS/MS. As far as we know, this is the first method for the analysis of these compounds that enables the simultaneous extraction and clean-up of complex matrices in one step, reducing the analysis time and the use of organic solvents, according to the principles of Green Chemistry. Moreover, the sensitivity and selectivity of the proposed method allow the achievement of low method quantitation limits. For all these reasons, this methodology could be an important tool in monitoring programs for the investigation of the fate and occurrence of APs and BPA in marine environment, in order to ensure a good quality of marine environment. Furthermore, this method could be used in food safety analysis. As an application, the analysis of mussels samples were carried out in order to obtain a first draw of the presence of these compounds in the Galician coast and to have a first approach of the potential damage to human health.

2. Experimental

2.1. Standards and reagents

Nonylphenol technical mixture (NP) 94% purity ($\pm 1\%$ tolerance) and 4-*n*-nonylphenol (4-*n*-NP) 99.9% purity ($\pm 0.5\%$ tolerance) were from Riedel-de Haën (Seelze, Germany). Bisphenol A (BPA) 99% purity ($\pm 0.5\%$ tolerance), 4-*tert*-octylphenol (4-*top*) 97% purity ($\pm 0.5\%$ tolerance) and 4-*n*-octylphenol (4-*OP*) 99% purity ($\pm 0.5\%$ tolerance) were obtained from Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany). All standard solutions (1000, 10 and 1 mg L^{-1}) containing all the compounds were prepared in methanol (SPS grade) from Romil Ltd (Cambridge, United Kingdom) and stored at 4 °C.

As surrogate internal standards, 4-*n*-nonylphenol-2,3,5,6-*d*₄ (NP-*d*₄) 99.3% was obtained from CDN Isotopes (Pointe-Claire, Canada) and solution of bisphenol A-*d*₁₆ (BPA-*d*₁₆) 99.5% in acetonitrile (100 mg L^{-1}) was from Dr. Ehrenstorfer GMBH (Augsburg, Germany).

For the extraction, methanol Super Purity from Romil was used (Cambridge, UK). Neutral alumina activity grade I and octadecyl functionalized silica gel (C18), florisil, aminopropyl silica and graphitized carbon were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). For the determination, methanol LC–MS PAI and ammonia (30%) for instrumental analysis were from Panreac (Barcelona, Spain). Water was purified with a Direct 5 Milli Q system (Millipore, Bedford, MA, USA).

2.2. Extraction conditions and equipments

In the optimized approach, 0.5 g of freeze-dried mussel samples (*Mytilus galloprovincialis*) was placed in an agate mortar containing the dispersing agent (C18, 1.5 g). In order to facilitate the PLE extraction of the target compounds, the mixture was blended with an agate pestle during 5 min until homogenization.

The pressurized liquid extraction was performed by an accelerated extraction solvent system ASE 200 instrument (Dionex, Sunnyvale, CA, USA). Stainless steel extraction cells (11 mL) were sealed at both ends with glass-fiber filters (\varnothing 19.8 mm) from Whatman (Kent, UK). The PLE extraction of the mussel samples was carried out with two cycles of methanol (100%). Other PLE conditions were: temperature, 40 °C; pressure 1500 psi; preheat time, 3 min; heat time, 5 min; static time 5 min; flush volume 60% and purge time, 60 s.

A clean-up sorbent (neutral alumina, 3 g) was placed at the bottom of the extraction cell for the simultaneous clean-up of the co-extracts. Neutral alumina was previously activated in a muffle furnace for 12 h at 350 °C and 5% water deactivated by hand shaking during 30 min.

The PLE extracts were reduced almost dryness in a Sincore® Analyt evaporator from Büchi Labortechnik AG (Flawil, Switzerland) at 50 °C during 45 min. The evaporated extracts were up to 1 mL and passed through a 0.2 μm syringe filter of PTFE (Teknokroma, Barcelona, Spain) before LC injection in order to remove any solid particles that might interfere in the analysis and damage the instrument. The scheme of a filled extraction cell was shown in Fig. 1.

2.3. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry

LC analyses were performed using an Agilent HP-1200 Series LC system equipped with an autosampler, a binary solvent pump and a thermostated column oven coupled to a mass spectrometer with a triple quadrupole detector (API 3200, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) equipped with an APCI/ESI source.

The LC–MS/MS protocol was previously optimized and described in Salgueiro-González et al. [30] for the determination of these compounds in seawater samples. Briefly, chromatographic

Table 1

Parent and fragment ions, retention times and MS/MS parameters for each compound.

Analyte	t_R (min)	Precursor ion (m/z)	Product ions (m/z)	Decustering potential (V)	Collision energy (V)	MRM ratio ^b
BPA- d_{16}	9.39 \pm 0.06	241 [M-D] [−]	142 ^a 221	−45	−44 −46	1.6 \pm 0.1
BPA	9.40 \pm 0.03	227 [M-H] [−]	212 ^a 133	−40	−24 −32	15.7 \pm 2.8
4-tOP	10.62 \pm 0.08	205 [M-H] [−]	133 ^a 116	−45	−30 −76	8.9 \pm 0.3
NP	10.89 \pm 0.09	219 [M-H] [−]	133 ^a 116	−40	−38 −74	5.8 \pm 0.1
4-OP	10.99 \pm 0.01	205 [M-H] [−]	106 ^a –	−50	−26 –	–
4- <i>n</i> -NP	11.23 \pm 0.07	219 [M-H] [−]	106 ^a 119	−45	−28 −44	22.4 \pm 0.4
NP- d_4	11.23 \pm 0.07	223 [M-D] [−]	109 ^a 129	−45	−28 −46	14.4 \pm 1.1

^a Quantitation ion.^b Ratio and tolerances between quantitation and confirmation MRM transitions according to Decision 2002/657/EC [36].

separation was carried out with a column Hypersil Gold C18 (150 mm \times 2.1 mm), 3 μ m Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA), and a mobile phase gradient water/methanol with 0.05% of ammonia as an eluant modifier. Injection volume was 25 μ L.

All compounds were detected with ESI interface operating in negative mode.

2.4. Quantitation and quality control

For the LC–MS/MS data acquisition, multiple-reaction monitoring (MRM) mode was chosen because it allows high sensitivity and selectivity. According to the Decision 2002/657/EC [31], four identification points (one precursor ion and two products ions) were required for a suitable confirmation of the compounds for LC–MS/MS analysis. The relation between the transitions (MRM ratio) was also used as criteria for the identification in samples analysis. Identification and quantitation parameters were shown in Table 1.

The quantitation of the compounds was carried out by a standard addition method. SPLE extracts were used to build the calibration curves for each sample. Deuterated standards were added to the final extracts in order to correct matrix effect during the ionization of the compounds. BPA- d_{16} was used as BPA internal standard whereas NP- d_4 was used to determine APs.

2.5. Blank contamination considerations

Blank contamination is a common problem in the determination of alkylphenols and bisphenol A at ultratrace levels. Different sources of contamination in the analysis of these compounds in

water samples by LC–MS/MS were considered in a previous work [32]. However, new sources of contamination in analysis of solid samples by PLE such as ASE filters and sorbents should be considered.

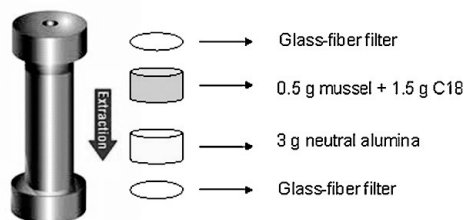
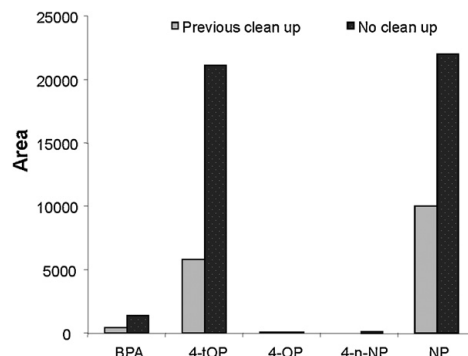
At first, procedural blank analysis revealed the presence of BPA, 4-tOP and NP at level of concentration >5 ng g^{−1} whereas no significant concentrations of 4-*n*-NP and 4-OP were found. In order to reduce blank problems, ASE glass fiber filters were pre-cleaned by PLE extraction with methanol at 150 °C at 2000 psi during 5 min. Moreover, the sorbents (C18 and neutral alumina) were also washed with methanol (extraction solvent) by sonication during 15 min and dried under nitrogen stream before the extraction procedure. The comparison between procedural blanks obtained with and without the pre-clean-up of the sorbents and ASE filters were shown in Fig. 2.

Taking into account these considerations, procedural blanks were frequently revised and kept lower than 0.1 ng g^{−1} for all compounds except for 4-tOP (0.4 ng g^{−1}) and NP (1.5 ng g^{−1}).

3. Results and discussion

3.1. Optimization of selective pressurized liquid extraction (SPLE) procedure

The following parameters were taking into consideration in the univariate optimization of the SPLE procedure: extraction solvent,

**Fig. 1.** Scheme of a filled extraction cell.**Fig. 2.** Effect of previous clean-up of ASE filters and sorbents on blank signal.

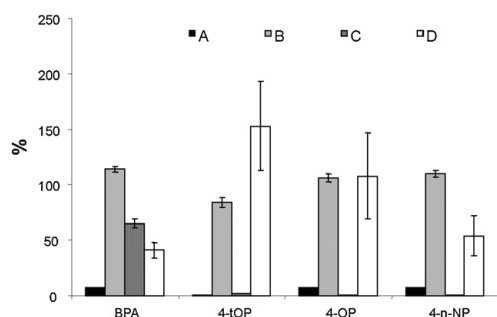


Fig. 3. Selection of the sorbent in the clean-up step ($n=2$): (A) florisil, (B) neutral alumina, (C) graphitized carbon and (D) aminopropyl silica.

temperature, dispersing agent and the sorbent used for the clean-up step. For the estimation of recoveries, dry mussel samples were spiked with the standard solution and closely mixed in an agate mortar in order to obtain a realistic contact between the sample and the added compounds.

Different extraction solvent and mixtures of solvents such as acetone, hexane, ethyl acetate or cyclohexane were employed in the literature in the analysis of the target compounds in solid matrices [17,20]. However, these solvents are rather selective and several interferences could be extracted. Moreover, large volumes of toxic solvents should be avoided according to the principles of Green Chemistry. In order to reduce the use of toxic solvents and avoid the extraction of some matrix interferences, methanol was selected as an extraction solvent due to its polarity and selectivity.

Temperature is other important parameter which could affect the PLE extraction yield. High temperature improves the efficiency of the extraction. However, matrix interferences could be extracted when high temperatures are used. Furthermore, degradation of 4-tOP and NP was demonstrated when temperatures $>50^{\circ}\text{C}$ were employed [33]. Thus, the minimum temperature allowable (40°C) is selected to avoid the degradation of the target compounds and the co-extraction of matrix interferences.

A dispersing agent is frequently used in PLE for improving the interactions between sample and extraction solvent, as well as ensuring the reproducibility of the extraction. In sample preparation of matrices with high lipid content, lipophilic sorbents are widely employed. As some authors assume, cell membranes could be disrupted through the solubilization of phospholipids component in C18 material [34]. In the analysis of the target compounds, octadecyl functionalized silica gel (C18) is employed [21] because of the non-polar Van der Waals interactions between the target analytes and the sorbent which could improve the extraction efficiency [11]. For these reason, C18 was selected as a dispersant agent.

To isolate the lipid fraction from the extracts and reduce the interferences in the analysis, different sorbents used for the clean-up step were studied. According to the literature [23,35], neutral alumina, florisil, graphitized carbon (120/400 mesh) and aminopropyl silica were tested.

A small amount of mussel sample (0.5 g) was spiked at a 200 ng g^{-1} concentration level of all compounds and dispersed with C18 (2 g); the mixture was placed in the ASE extraction cell which contains 3 grams of the each studied sorbent. The selected PLE conditions were: temperature, 40° ; pressure 1500 psi and 2 cycles of methanol (static time 5 min) for ensuring the complete extraction of all compounds. The PLE extracts were evaporated to almost dryness and up to 1 mL. The final extracts were filtered through PTFE syringe filters and injected in LC–MS/MS.

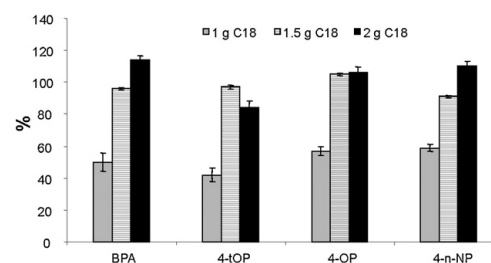


Fig. 4. Influence of amount of dispersing agent in SPLE ($n=2$).

As can be seen in Fig. 3, the best results were obtained with neutral alumina, which is the only sorbent that allows the quantitative extraction of all compounds. Lower recoveries ($<10\%$) were shown with florisil and graphitized carbon due to the possible retention of the target compounds [35]. With aminopropyl silica, better recoveries were obtained ($>60\%$); however, this sorbent was discarded taking into account the higher deviation of the results in the case of octylphenols. Thus, neutral alumina was chosen for the clean-up step. The selected amount of sorbent (3 g) was enough to eliminate the lipid fraction; consequently, no more studies of the clean-up step were carried out.

Another studied parameter was the ratio between the sample and the dispersing agent. Generally, ratios ranging from 1:1 to 1:4 were employed, depending on the physical–chemical characteristics of the dispersing agent [36]. Consequently, 0.5 g of mussel sample was dispersed with 1–2 g of C18. Fig. 4 shows that the obtained recoveries with 1.5 g of C18 were two times as the obtained with 1 g of C18. No improvements were observed with 2 g; therefore, 1.5 g was selected in order to minimize the amount of sorbent.

Finally, a chromatogram of a mussel sample spiked at a 200 ng g^{-1} concentration level of all compounds is shown in Fig. 5.

3.2. Matrix effect

Matrix effect (ME) is a common phenomenon in electrospray ionization (ESI). In order to evaluate this effect, the peak areas obtained when a standard solution in methanol is injected in the LC–MS ($150\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ of each compounds) was compared to the peak areas belong to a spiked mussel sample at the same level of concentration, according with the following equation [37]:

$$\text{ME (\%)} = \frac{\text{Area mussel sample} \times 100}{\text{Area standard}}$$

In absence of matrix effect, the ME would be approximately 100%. However, when the matrix components interfere in the ionization, signal suppression ($<100\%$) or signal enhancement ($>100\%$) could take place. In our study, the ME were lower than 20% in all cases which demonstrate an elevate signal suppression due to the matrix interferences. In order to avoid a tedious clean-up of the extracts and taking into account the short time of the LC–MS/MS determination (14 min), standard addition calibration was used for the reliable quantitation of the target compounds.

3.3. Method validation

The analytical methodology was validated in terms of sensitivity, selectivity accuracy and precision. Due to the fact that there are not certificated reference materials available of these compounds in any biota matrix, the figures of merit of the method were evaluated analyzing spiked mussel samples.

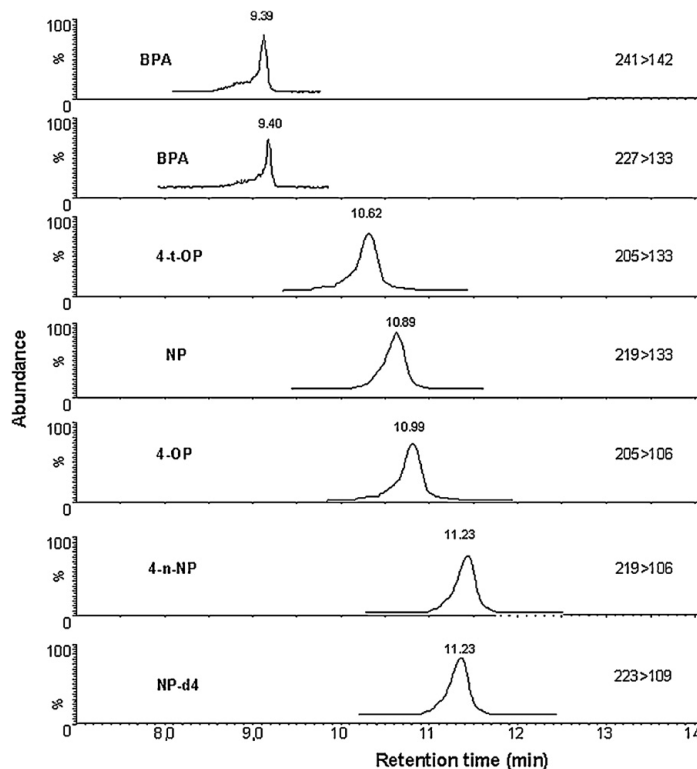


Fig. 5. LC-MS/MS chromatogram of a spiked mussel sample (200 ng g⁻¹ of each compound and 100 ng g⁻¹ of internal standards).

Linearity was evaluated between 0.001 and 10,000 ng g⁻¹ using ten calibration points ($n=3$). The response was linear ($r > 0.9985$) between the MQL and 5000 ng g⁻¹.

According to the Decision Commission 2002/657/EC, precision and accuracy (Table 2) for each compound were determined at three different concentrations levels, which are distributed over the linear range: low, medium and high concentration (5, 50 and 500 ng g⁻¹ in mussel samples).

To evaluate the accuracy, the analytical recoveries of spiked samples were calculated using a standard addition calibration curve with five points. Mean recoveries ($n=7$) ranged from 80 to 107% for all concentrations and all compounds.

The repeatability was calculated as within-day RSD of concentrations, using seven replicates of spiking mussels samples analyzed with the proposed method during the same day and the same analyst and equipment. For intermediate precision, ten replicates of spiked mussels were analyzed with the proposed method during different days along 2 weeks and the same analyst and equipment. In all cases, the repeatability and the intermediate precision of the method were satisfactory, with RSD < 20%.

The method detection limit (MDL) and method quantitation limit (MQL) were estimated as $X_b + 3SD_b$ (X_b : average and SD_b : standard deviation of the ten blank samples) and $X_b + 10SD_b$, respectively. Due to the fact that blank mussel samples are not easily found, samples from pristine areas were selected. These values were shown in Table 2 and ranged from 0.34 (4-*n*-OP) to 3.6 ng g⁻¹ (NP).

Uncertainty of the analytical method was also estimated on the basis of in-house validation data according to EURACHEM/CITAC

guide for all compounds at three spiking levels. The main sources of uncertainty were identified and quantified and combined uncertainty (u_c) was calculated as follows:

$$u_c(y) = \sqrt{u_1^2 + u_2^2 + u_3^2}$$

where the uncertainties associated with the spiked sample (u_1), precision (u_2) and accuracy (u_3) were taken into account. The expanded uncertainty (U_{exp}) was estimated using the coverage factor (k) as 2 for a level of confidence of 95%.

$$U_{exp} = k * u_c$$

Due to the fact that validation was carried out using spiked samples (certificate reference materials were not available), the preparation of the standards and the concentration spiked in sample (C_{sample}) had to be considered. The uncertainty associated with the spiked sample (u_1) was calculated considering the contribution of the following factors: standards, pipettes, flask and balance.

$$u_1 = C_{sample} * \sqrt{\left(\frac{S_{standard}}{C_{standard}}\right)^2 + \left(\frac{S_{pipette}}{V_{pipette}}\right)^2 + \left(\frac{S_{flask}}{V_{flask}}\right)^2 + \left(\frac{S_{balance}}{m_{standard}}\right)^2}$$

The uncertainty associated with the precision (u_2) was expressed as a relative standard deviation obtained from the intermediate precision ($N=10$).

$$u_2 = \frac{S_{intprec}}{\sqrt{N}}$$

Table 2

Accuracy, precision, method detection limit (MDL), method quantitation limit (MQL) and uncertainty of target compounds in mussel samples with SPLE–LC–MS/MS.

Analyte	Concentration in sample \pm uncertainty ^a (ng g ⁻¹)	Accuracy (%)	Precision (%)			Experimental limits	
		Recovery (<i>n</i> = 7)	Repeatability (<i>n</i> = 7)	Intermediate precision (<i>n</i> = 10)		MDL (ng g ⁻¹)	MQL (ng g ⁻¹)
BPA	5 \pm 0.55	99	8	15		0.9	3.3
	50 \pm 6.23	93	3	4			
	500 \pm 44.27	95	3	6			
4-t-OP	5 \pm 2.1	80	8	13		1.1	2.6
	50 \pm 7.07	102	5	7			
	500 \pm 134.8	85	8	10			
4-OP	5 \pm 0.88	96	6	17		0.5	1.7
	50 \pm 1.71	100	4	5			
	500 \pm 128.1	88	4	6			
4-n-NP	5 \pm 0.55	96	9	14		0.8	2.3
	50 \pm 2.50	101	4	7			
	500 \pm 92.76	93	5	7			
NP	5 \pm 0.78	107	8	17		1.4	4.7
	50 \pm 4.61	97	5	10			
	500 \pm 171.5	87	6	7			

^a Expanded uncertainty (*U*) about the mean with coverage factor 2 (95% of confidence).**Table 3**Combined (*u_c*) and relative expanded uncertainties (*U_{exp}*%) estimated for each analyte considering the uncertainty associated to the spiked samples (*u₁*), to the precision (*u₂*) and to the accuracy (*u₃*).

Concentration in sample (ng g ⁻¹)	Analyte	<i>u₁</i>	<i>u₂</i>	<i>u₃</i>	<i>u_c</i>	<i>U_{exp}</i> (%)
5	BPA	0.00492	0.0840	0.0265	0.549	11
	4-tOP	1.09	0.0540	0.0171	2.14	33
	4-OP	0.112	0.0886	0.0280	0.873	17
	4-n-NP	0.0352	0.0644	0.0203	0.554	11
	NP	0.125	0.0366	0.0115	0.779	16
50	BPA	8.86	0.204	0.0645	6.22	12
	4-tOP	9.94	0.359	0.1135	7.07	14
	4-OP	0.0210	0.267	0.0845	1.71	3
	4-n-NP	0.199	0.369	0.116	2.50	5
	NP	2.59	0.522	0.165	4.61	9
500	BPA	400	3.00	0.949	44.2	9
	4-tOP	4356	3.08	0.975	134	27
	4-OP	3969	2.56	0.810	128	26
	4-n-NP	1960	3.08	0.975	92.7	19
	NP	7225	2.54	0.803	171	34

Finally, the uncertainty associated with accuracy was evaluated. At first, a test *t*-Student was used to determine whether the mean experimental recovery (*X*) was significantly different from the theoretical spiked value (*μ*) of concentration, according to the equation:

$$u_3 = \frac{S_{rec}}{\sqrt{N}}$$

$$t_{exp} = \frac{|X - \mu|}{u_3}$$

The *t_{exp}* values were compared with the 2-tailed theoretical value (*n* – 1 degrees of freedom at 95% of confidence, where *n* is the number of replicates used to estimate recoveries). If these values are higher than or equal to the theoretical value (*t_{4,95%}*), experimental mean is significantly different from the theoretical spiked value, so the uncertainty associated to the accuracy (*u₃*) have to be taken into account.

Table 3 shows all values of these individual uncertainties, the uncertainty combined and the relative expanded uncertainty of target compounds in mussels at different concentrations. The relative expanded uncertainty was lower than 20% for among all compounds.

3.4. Comparison with other reported methods

The proposed analytical methodology has important advantages in comparison with other reported methods such as sensitivity, selectivity, fastness and automaticity. The extraction and purification were carried out simultaneously which simplify the experimental process (reducing sources of contamination). Moreover, the method consumes small volumes of toxic solvent contrary to classic extraction techniques [11,19], according to the principles of Green Chemistry. To the best of our knowledge, this is the first analytical method based on the determination of APs and BPA by SPLE–LC–MS/MS. Among all previous papers are based on a GC–MS determination [23,24] which requires an additional derivatization

Table 4Concentrations (ng g⁻¹ dw) of alkylphenols and bisphenol A in mussel samples collected in Galicia.

Analyte	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
BPA	n.d.	11.2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
4-tOP	23.7	31.6	24.2	24.1	116.3	9.3	24.6
4-OP	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
4-n-NP	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
NP	372	140	292	67.8	9.04	16.8	242

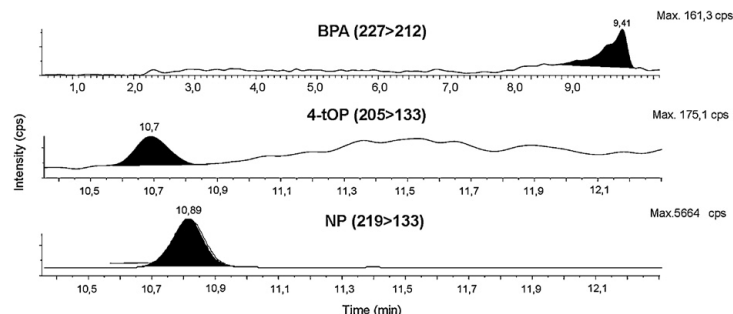


Fig. 6. LC-MS/MS chromatogram of a real mussel sample analyzed with the proposed analytical methodology.

step. In addition, the proposed analytical methodology allows the achievement of lower method quantitation limits ($<5 \text{ ng g}^{-1}$) than other reported methods [2,17] analysing only 0.5 g of mussel sample; consequently, it could be a useful tool in monitoring programs to control the presence of these compounds in marine environment.

3.5. Levels of alkylphenols and bisphenol A in mussel samples and intake estimations

In order to demonstrate the feasibility and applicability of the proposed SPLE-LC-MS/MS method seven mussel samples obtained from different coastal sites of Galicia (NW Spain) were analyzed. The concentrations measured in these samples were shown in Table 4.

As expected, 4-*n*-NP and 4-OP were not detected in any sample. BPA was only observed in one sampling point (M2) which is close to an urban area (295,000 inhabitants). NP and 4-*t*OP were measured in all samples at concentrations between $9\text{--}372 \text{ ng g}^{-1}$ and $9\text{--}31 \text{ ng g}^{-1}$ dw, respectively. The chromatogram of one of these samples (M2) is shown in Fig. 6.

In comparison with previous published data, the concentrations showed in this work are similar to those reported in Mediterranean coast (lower than 200 ng g^{-1} dw) [11,19,38], Masan Bay of Korea (50.2 and 298.2 ng g^{-1} dw) [23] and in North Sea and Baltic Sea ($3\text{--}112 \text{ ng g}^{-1}$ dw) [25]. However, these levels are lower than concentrations measured in coastal zones in the South and Southeast of Asia ($0.73\text{--}1437 \text{ ng g}^{-1}$ dw) [17].

Finally, as a first approach, the possible damage of human health as a consequence of the ingestion of contaminated mussels was also estimated and no potential risk was found. The daily intake of APs were calculated as the ratio of the daily quantity of seafood consumed in one day (31.8 g per day for an adult [13]) and the levels of APs measured in mussel samples. Taking into account the average concentrations of 4-*t*OP and NP showed in Table 4, an intake of $3 \mu\text{g/adult/day}$ for 4-*t*OP and $37.2 \mu\text{g/adult/day}$ for NP were obtained. In the case of NP, this intake is below the TDI proposed for the Danish Institute of Safety and Toxicology ($300 \mu\text{g/adult/day}$). Although there is not proposed TDI for 4-*t*OP, this value was estimated in previous studies [13]. A TDI of $600 \mu\text{g/adult/day}$ were considered based on toxicological studies.

4. Conclusions

The analytical methodology proposed in this work enables the simultaneous extraction and clean-up of all the target compounds from complex matrices in one step, reducing the use of organic solvents and the sample treatment time (12 samples \times 1 h) according to the principles of Green Chemistry. With the proposed analytical methodology satisfactory reproducibility and accuracy were

obtained. Moreover, the sensitivity and selectivity of the method allow the achievement of low method quantitation limits.

The proposed method was applied to mussel samples from different coastal zones of Galicia with satisfactory results. NP and 4-*t*OP were measured in all samples which show the ubiquity and bioaccumulation of these compounds. However, in a first approach, no risk for human health by the possible ingestion of mussels was found.

For all these reasons, this method has demonstrated feasibility to be incorporated in monitoring programs in order to obtain a database of these compounds in marine environment and control the good quality of this aquatic environment. Furthermore, the proposed methodology could be applied in seafood safety analysis to evaluate possible damage to human health.

Acknowledgements

This work has been financially supported by Xunta de Galicia (Ref: O9MDS038103-PR) and Ministry of Agriculture, Food and Environment (Encomienda Gestion IEO-MAGRAMA 2010–2012). The authors would like to thank the staff of the Project 1-ESMAROS at the Spanish Oceanographic Institute (IEO) for their cooperation. N. Salgueiro-González acknowledges University of A Coruña for Ph.D. grant and G. Fernández-Martínez (SAI-UDC) by the LC-MS/MS support.

References

- [1] M. Petrovic, D. Barcelo, *Chromatographia* 56 (2002) 535.
- [2] C.E. Gattullo, H. Bahrs, C.E.W. Steinberg, E. Loffredo, *Sci. Total Environ.* 416 (2012) 501.
- [3] C.-Y. Cheng, L.-L. Liu, W.-H. Ding, *Chemosphere* 65 (2006) 2152.
- [4] G.-P. Yang, H.-Y. Ding, X.-Y. Cao, Q.-Y. Ding, *Mar. Pollut. Bull.* 62 (2011) 2362.
- [5] Directive 2000/60/EC, Establishment and Framework for Community Action in the Field of Water Policy, European Parliament and the Council of the European Union, 2000.
- [6] Directive 2008/105/EC, Environmental Quality Standards in the Field of Water Policy, Amending and Subsequently Repealing Council Directives 82/176/EEC, 83/513/EEC, 84/156/EEC, 84/491/EEC, 86/280/EEC and Amending Directive 2000/60/EC, European Parliament and the Council of the European Union, 2008.
- [7] Common Implementation Strategy for the Water Framework Directive, Environmental Quality Standards (EQS), Substance Data Sheet (24): Nonylphenol and 4-nonylphenol, 2005.
- [8] Common Implementation Strategy for the Water Framework Directive, Environmental Quality Standards (EQS), Substance Data Sheet (25): Octylphenols (4-tert-pctylphenols), 2005.
- [9] Directive 2008/56/EC, Establishment and Framework for Community Action in the Field of Marine Environmental Policy (Marine Strategy Framework Directive), European Parliament and the Council of the European Union, 2008.
- [10] G. Pojana, A. Gomiero, N. Jonkers, A. Marcomini, *Environ. Int.* 33 (2007) 929.
- [11] V. Fernandez-Gonzalez, E. Concha-Grana, S. Muniategui-Lorenzo, P. Lopez-Mahia, E. Fernandez-Fernandez, D. Prada-Rodriguez, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 3741.
- [12] A. Bouzas, D. Aguado, N. Marti, J. Manuel Pastor, R. Herreraez, P. Campins, A. Seco, *Environ. Monit. Assess.* 176 (2010) 169.

- [13] F. Ferrara, N. Ademollo, M. Delise, F. Fabietti, E. Funari, *Chemosphere* 72 (2008) 1279.
- [14] S. Tavazzi, E. Benfenati, D. Barcelo, *Chromatographia* 56 (2002) 463.
- [15] I. Schmitz-Afonso, J.E. Loyo-Rosales, M.D. Aviles, B.A. Rattner, C.P. Rice, *J. Chromatogr. A* 1010 (2003) 25.
- [16] S. Berkner, G. Streck, R. Herrmann, *Chemosphere* 54 (2004) 575.
- [17] T. Isobe, H. Takada, M. Kanai, S. Tsutsumi, K.O. Isobe, R. Boonyatumanond, M.P. Zakaria, *Environ. Monit. Assess.* 135 (2007) 423.
- [18] P. Navarro, J. Bustamante, A. Vallejo, A. Prieto, A. Usobiaga, S. Arrasate, E. Anakabe, E. Puy-Azurmendi, O. Zuloaga, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 5890.
- [19] J. Sánchez-Avila, M. Fernandez-Sanjuan, J. Vicente, S. Lacorte, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 6799.
- [20] S.N. Pedersen, C. Lindholst, *J. Chromatogr. A* 864 (1999) 17.
- [21] B. Shao, H. Han, D.M. Li, Y. Ma, X.M. Tu, Y.G. Wu, *Food Chem.* 105 (2007) 1236.
- [22] B. Shao, H. Han, X.M. Tu, L. Huang, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 850 (2007) 412.
- [23] J. Wang, M. Dong, W.J. Shim, N. Kannan, D. Li, *J. Chromatogr. A* 1171 (2007) 15.
- [24] X. Zhang, Y. Gao, Q. Li, G. Li, Q. Guo, C. Yan, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 61 (2011) 93.
- [25] A. Wenzel, W. Bohmer, J. Muller, H. Rudel, C. Schroter-Kermani, *Environ. Sci. Technol.* 38 (2004) 1654.
- [26] P.T. Anastas, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 29 (1999) 167.
- [27] S. Armenta, S. Garrigues, M. de la Guardia, *Trends Anal. Chem.* 27 (2008) 497.
- [28] B. Subedi, M.A. Mottaleb, C.K. Chambliss, S. Usenko, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 6278.
- [29] E. Martínez, O. Gans, H. Weber, S. Scharf, *Water Sci. Technol.* 50 (2004) 157.
- [30] N. Salgueiro-González, E. Concha-Graña, I. Turnes-Carou, S. Muniategui-Lorenzo, P. López-Mahía, D. Prada-Rodríguez, *J. Chromatogr. A* 1223 (2012) 1.
- [31] Commission Decision 2002/657/EC, Implementing Council Directive 96/23/EC Concerning the Performance of Analytical Methods and Interpretation of Results, 2002.
- [32] N. Salgueiro-González, E. Concha-Graña, I. Turnes-Carou, S. Muniategui-Lorenzo, P. López-Mahía, D. Prada-Rodríguez, *Talanta* 101 (2012) 413.
- [33] M. Petrovic, S. Lacorte, P. Viana, D. Barcelo, *J. Chromatogr. A* 959 (2002) 15.
- [34] M. Zhao, F. van der Wielen, P. de Voogt, *J. Chromatogr. A* 837 (1999) 129.
- [35] R. Gadzala-Kopciuch, A. Filipiak, B. Buszewski, *Talanta* 74 (2008) 655.
- [36] A.L. Capriotti, C. Cavaliere, P. Giansanti, R. Gubbiotti, R. Samperi, A. Laganà, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2521.
- [37] T. Benijts, R. Dams, W. Lambert, A. De Leenheer, *J. Chromatogr. A* 1029 (2004) 153.
- [38] F. Ferrara, F. Fabietti, M. Delise, A.P. Bocca, E. Funari, *Environ. Sci. Technol.* 35 (2001) 3109.

ANEXO VII

Occurrence of endocrine disrupting compounds in five estuaries of the Northwest coast of Spain: Ecological and human health impact

Chemosphere, 131 (2015) 241-247



Contents lists available at ScienceDirect

Chemosphere

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chemosphere

Occurrence of endocrine disrupting compounds in five estuaries of the northwest coast of Spain: Ecological and human health impact



N. Salgueiro-González^a, I. Turnes-Carou^a, L. Viñas-Diéguez^b, S. Muniategui-Lorenzo^{a,*}, P. López-Mahía^a, D. Prada-Rodríguez^a

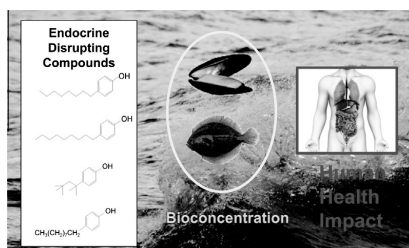
^a Grupo Química Analítica Aplicada (QANAP), Instituto Universitario de Medio Ambiente (IUMA), Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias, Universidade da Coruña, Campus de A Coruña, E-15071 A Coruña, Spain

^b Centro Oceanográfico de Vigo, Instituto Español de Oceanografía, IEO, Subida a Radio Faro, 50, 36390 Vigo, Spain

HIGHLIGHTS

- First study about occurrence of APs and BPA in 5 estuaries of NW Spain.
- Harbours, WWTPs and industrial discharges main sources of contamination.
- 4-*tert*-Octylphenol water levels higher than EQS of Directive 2013/39/EU.
- Calculation of risk quotient. Low and medium ecological impact.
- Estimation of the possible risk to biota and human health. No risk was evidenced.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 October 2014

Received in revised form 17 December 2014

Accepted 19 December 2014

Available online 30 January 2015

Handling Editor: Caroline Gaus

Keywords:

Alkylphenols

Bisphenol A

Directive 2013/39/EU

Risk quotient

Human health impact

ABSTRACT

The occurrence and spatial distribution of alkylphenols (4-*tert*-octylphenol, 4-*n*-octylphenol, 4-*n*-nonylphenol, nonylphenol) and bisphenol A were examined in five estuaries along the Northwest coastal area of Spain. As far as we know, no previous works about this topic could be found in the literature. A total of 98 seawater samples were collected during May 2011–July 2012 and analyzed by a highly sensitive DLLME–LC–MS/MS methodology recently developed. Results indicated nonylphenol was the most ubiquitous compound with maximal concentration of $0.337 \mu\text{g L}^{-1}$ (Ría de Vigo). The environmental quality standards (EQS) established in Directive 2013/39/EU for 4-*tert*-octylphenol were slightly exceeded in some sampling points. Fishing harbours, water treatment plant and industrial discharges were supposed as the main sources of contamination. Low and medium ecological risk was determined in all estuaries. Possible endocrine effects on biota and population were estimated in terms of estrogenic activity and daily intake respectively, and no risk was found in any case.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Endocrine disrupting compounds (EDCs) have attracted public attention in the recent years due to their capability to affect the development, growth, reproduction and behaviour of human beings and wildlife (Diamanti-Kandarakis et al., 2009). Since

1999, European Commission has worked on the problem of endocrine disruption through the adopted strategy “Community Strategy for Endocrine Disruptors – a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wild life” (EU, 1999) which try to identify its causes, consequences and a policy action to respond quickly and effectively to this problem. More recently, the United Nations Environment Programme (UNEP) and the World Health Organization (WHO) also published a full report in

* Corresponding author. Tel.: +34 981 167000; fax: +34 981 167065.

E-mail address: smuniat@udc.es (S. Muniategui-Lorenzo).

which exposure to endocrine disrupting compounds, sources and effects were considered (WHO, 2012).

A wide range of EDCs, such as alkylphenols (APs) and bisphenol A (BPA), have been identified in coastal and marine environments due to an incomplete elimination in sewage treatment plants, producing sexual dysfunction or cancer in organisms and changing the ecosystem balance at low concentrations (Sánchez-Avila et al., 2011).

These estrogenic EDCs are widely used in industrial and household applications. APs are used as plasticizers in high density polyethylene (HDPE), polyethyleneterephthalate (PET) and polyvinylchloride (PVC) and also in the manufacture of textiles, paper and agricultural chemical products (Salgueiro-González et al., 2012a). Meanwhile, BPA is used as a monomer for the production of epoxy resins, phenol resins, polycarbonates, polyesters and lacquer coatings for food cans (Ahn et al., 2007). Because of its toxicity, the use of this pollutant in plastic infant feeding bottles manufacturing was restricted by Directive 2011/8/EU of 28 January 2011 amending Directive 2002/72/EC (Directive, 2011).

In order to preserve and maintain the biodiversity of marine ecosystems, and protect public health, Marine Strategy Framework Directive (MSFD) 2008/56/EC (Directive, 2008a) requires from the Member States to establish and implement programs for monitoring of hazardous compounds in marine environment. Hence, both non-synthetic and synthetic compounds, such as priority substances under Water Framework Directive (WFD) 2000/60/EC (Directive, 2000) should be considered.

Taking into account the discharges, emissions, impacts and losses of hazardous substances (including APs), Environmental Quality Standards (EQS) were set in Directive 2008/105/EC (Directive, 2008b) and the recent Directive 2013/39/EU (Directive, 2013) with the aim of achieving a good surface water chemical status, according to the WFD.

However, the inclusion of BPA has been controversial. The Directive 2008/105/EC (Directive, 2008b) considered this compound as “possible future priority substance” while it was not prioritized by Directive 2013/39/EU (Directive, 2013). Toxicological effects of BPA have been demonstrated in human and animals (Venisse et al., 2014) and, furthermore, risk assessment models demonstrated that aquatic systems may not be protected from adverse effects at the current predicted no-effect concentration (PNEC) established value ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) (Wright-Walters et al., 2011). Consequently, and in our opinion, more studies are needed to take an adequate decision.

The ubiquity of the target compounds in freshwater ecosystem is well-known; however, data about the presence of these pollutants in marine environment is still limited. Coastal and estuarine areas are the most seriously affected by pollution impacts (urban, industrial and agricultural discharges) posing a risk to organisms and human health and therefore, the assessment of seawater quality is required.

APs and BPA were determined in different estuaries around the world (Ferguson et al., 2001; Pojana et al., 2004; Sánchez-Avila et al., 2011; Arditoglou and Voutsas, 2012). Nevertheless, and as far as we know, no previous works related to the presence of these EDCs in the studied area (NW Spain) can be found in the literature.

The most important estuaries in terms of tourism and industrial, fishing, shipping and aquaculture activities, such as mussel and oyster farming (located in Galician and Cantabrian coast) are considered in this research. In fact, Galicia is the first European producer of cultured mussels, with an annual production of 250000 tons (135×10^6 Euros); moreover, shellfish production in this region ranks first in Spain, with more than 10% of the total production (Quelle et al., 2011).

The main objectives of this paper are: (1) to comprehensively investigate the occurrence and spatial distribution of APs (including linear isomers) and BPA in five estuaries in the NW of Spain,

located in Galician Atlantic coast (*Ría de Arousa*, *Ría de Vigo*, *Ría de Pontevedra* and *Ría de A Coruña*) and Bay of Biscay (*Santander*) which are affected by urban, agricultural, industrial and marine activities. For the first time, data on the level of these compounds in these regions are provided; (2) to evaluate the possible anthropogenic sources of pollution in these estuaries in order to control and minimize them; (3) to assess the environmental impact that these pollutants pose to aquatic system, determining the ecological risk quotient; (4) to estimate the possible endocrine effects of these EDCs on biota and population of these areas.

2. Materials and methods

Information about chemicals and suppliers is provided in Supplementary Material.

2.1. Study area and sample collection

As it can be seen in Fig. S1, different coastal areas located in the Northwest of Spain were selected according to their industrial and urban development. Four of the largest “rías” (coastal inlets formed after some river valleys sunk) in Galicia were investigated: *Ría de Arousa* (37 samples), *Ría de Vigo* (38 samples), *Ría de Pontevedra* (11 samples) and *Ría de A Coruña* (8 samples). One sampling area situated in Santander/Bay of Biscay (4 samples) was also considered. The location of the sampling points in each area can be seen in Fig. S2. It is known that these areas are subject to the socioeconomic impacts generated by touristic, industrial, fishing and aquaculture activities. Furthermore, harbour and business activities such as maritime traffic and ship discharge also occur.

The studied area consists of coastal and transitional waters; in the transition zone between land and ocean, morphology parameters reflect historical and present-day changes in sea level, human activities within the coastal area, river loads and sediment (Besada et al., 2008). Sampling points were chosen near possible sources of contamination as well as locations where no sources were known and “background levels” were expected.

Water samples were collected during May 2011–July 2012. Glass containers (2L) previously precleaned were used for the sampling and stored refrigerated at 4 °C before the analysis. Due to the low stability of APs and BPA (Salgueiro-González et al., 2012a), samples had to be analyzed within five days of their sampling.

2.2. Sample preparation and analytical determination. QA/QC

Samples were analyzed according to an analytical methodology previously published (Salgueiro-González et al., 2012b), based on a dispersive liquid–liquid extraction (30 mL of non-filtered seawater samples) followed by a high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry determination (DLLME–HPLC–MS/MS). More details about analytical methodology can be found in Supplementary Material.

QA/QC was performed to ensure reliable results in the analysis. As these compounds were used as plasticizers and/or surfactants, plastic material and detergents were discarded to avoid contamination and blank problems. Furthermore, glassware was carefully washed with acetone, Milli-Q water and methanol prior to use (Salgueiro-González et al., 2012a). All procedural blanks were far below that previously established method quantitation limits (MQL) showed in Table S1.

3. Results and discussion

3.1. Levels and possible sources of APs and BPA in the study area

Range and mean concentrations of the target compounds (calculated as the average of positive samples) measured in five estuaries were shown in Table 1.

Differences between the concentrations of linear and branched isomers of APs could be noticed. Linear isomers (4-*n*-OP and 4-*n*-NP) were scarcely found in two of the estuaries (Ría de Arousa and Ría de Vigo) and at very low concentrations ($<0.02 \mu\text{g L}^{-1}$); meanwhile, branched isomers (4-*t*-OP and NP) were determined in almost all estuaries at higher concentrations (<0.008 – 0.072 and <0.030 – $0.337 \mu\text{g L}^{-1}$, respectively), which can be explained by their wide use in industrial and household applications. The EQS set by the Directive 2013/39/EU for 4-*t*-OP ($0.01 \mu\text{g L}^{-1}$) was exceeded in all positive samples whereas the corresponding to 4-NP ($2 \mu\text{g L}^{-1}$) was not surpassed in any sampling point.

Meanwhile, BPA was determined in three estuaries (Ría de Vigo, Ría de Pontevedra and Ría de A Coruña). Although this compound was only observed in six sampling points, the measured concentrations were higher than $0.083 \mu\text{g L}^{-1}$, with a maximum value of $0.146 \mu\text{g L}^{-1}$ (Ría de Pontevedra).

The spatial distribution of APs and BPA and the main possible sources of contamination in the studied estuaries were shown in Fig. 1. Due to the fact that no compounds were detected in Santander (Bay of Biscay), this estuary was discarded in the following discussion. In Ría de Arousa (Fig. 1A), BPA was not found in any sampling point whereas branched APs were detected in all samples. Linear and branched isomers of APs were only determined in sample AS09, close to Illa de Arousa and Vilagarcía de Arousa. The presence of 4-*n*-NP and 4-*n*-OP in water suggested that the WWTP of these cities could discharge these compounds. Furthermore, the highest concentrations of these pollutants were measured in samples from AS17 to AS29, which were located near Ribeira (27 000 inhabitants). This coastal town has an important harbour and a yacht club, in which sailing and fishing activities

are carried out. Cleaning and other chemical products could be considered as sources of contamination (Arditsoglou and Voutsas, 2012).

Different concentrations were shown in Ría de Vigo (Fig. 1B). No compounds were detected in approximately 50% of the sampling points; however, higher concentrations than in Ría de Arousa were measured in positive samples. Levels of NP higher than $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ were found in samples VS13 and VS14, located in the harbour and yacht club of Vigo, the most important coastal city of the estuary (~300 000 inhabitants), where fishing and shipping activities are developed. Again, ship traffic and chemical products could be sources of contamination. The highest concentrations of this compound were found in Cangas do Morrazo (VS30 and VS31) which indicates that this compound was not completely removed in the WWTP. Significant levels of BPA were determined in the mouth of the estuary (VS37 and VS38) close to Oia (~3000 inhabitants), which can be explained by the WWTP effluent impact. In this case, BPA came from industrial discharges that reached the WWTP, where this compound was not totally removed. However, an exhaustive study would be necessary to detect the main sources of contamination.

Lower levels of compounds were found in Ría de Pontevedra (Fig. 1C) and Ría de A Coruña (Fig. 1D). Furthermore, the predominant compound in both cases was BPA. The presence of the target compounds in Ría de Pontevedra was measured in two sampling points: PS8 and PS11. The first one is in the mussel cultivation area, nevertheless BPA at the concentrations detected at this point does not pose any risk to human health from the ingestion of mussels cultivated in this zone (more details in Section 3.3.2). The PS11 point is located near Marín (26 000 inhabitants), and the presence of BPA at this sampling point may be attributed to industrial discharges.

In Ría de A Coruña, only one sample (SC12) showed the presence of BPA, with a concentration of $0.083 \mu\text{g L}^{-1}$. No sources of contamination could be attributed because only one positive sample was found in this estuary.

The obtained results for BPA, 4-*t*-OP and NP were similar to the concentrations found in Jamaica (0.008 – $0.420 \mu\text{g L}^{-1}$) and Venice

Table 1

Range, number of positive samples and mean concentrations of these positive samples ($\mu\text{g L}^{-1}$) of BPA and APs from each estuary. Main sources of contamination.

	Ría de Arousa	Ría de Vigo	Ría de Pontevedra	Ría de A Coruña	Bay of Biscay Santander
Total number of samples	37	38	11	8	4
4- <i>t</i> -OP ^a					
Range	$<\text{MQL}$ – 0.072	$<\text{MQL}$ – 0.01	$<\text{MQL}$	$<\text{MQL}$	$<\text{MQL}$
Positive samples	14	1	0	0	0
Mean	0.03	0.01	–	–	–
4- <i>o</i> -P ^a					
Range	$<\text{MQL}$ – 0.009	$<\text{MQL}$	$<\text{MQL}$	$<\text{MQL}$	$<\text{MQL}$
Positive samples	1	0	0	0	0
Mean	0.009	–	–	–	–
4- <i>n</i> -NP ^b					
Range	$<\text{MQL}$ – 0.013	$<\text{MQL}$ – 0.016	$<\text{MQL}$	$<\text{MQL}$	$<\text{MQL}$
Positive samples	5	2	0	0	0
Mean	0.084	0.012	–	–	–
NP ^b					
Range	0.037 – 0.240	$<\text{MQL}$ – 0.337	$<\text{MQL}$ – 0.054	$<\text{MQL}$	$<\text{MQL}$
Positive samples	37	20	1	0	0
Mean	0.084	0.103	0.054	–	–
BPA					
Range	$<\text{MQL}$	$<\text{MQL}$ – 0.117	$<\text{MQL}$ – 0.146	$<\text{MQL}$ – 0.083	$<\text{MQL}$
Positive samples	0	3	2	1	0
Mean	–	0.056	0.119	0.083	–
Main sources of contamination	WWTP input and harbour activities	WWTP input and harbour activities	Industrial discharges	–	–

^a MAC-EQS is $0.01 \mu\text{g L}^{-1}$ for octylphenols (4-(1,1',3,3'-tetramethylbutyl)-phenol) in other surface waters.

^b MAC-EQS is $2 \mu\text{g L}^{-1}$ for nonylphenols (4-nonylphenol) in other surface waters.

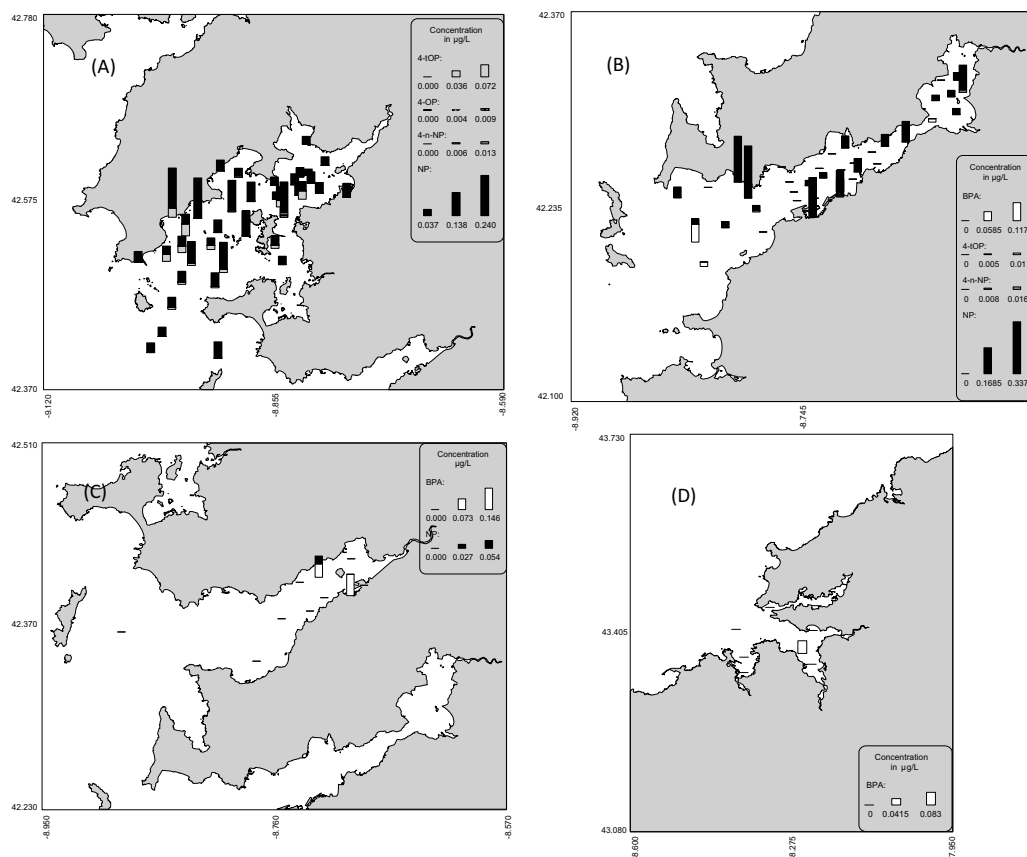


Fig. 1. Levels ($\mu\text{g L}^{-1}$) and spatial distribution of APs and BPA in the studied estuaries: (A) Ría de Arousa, (B) Ría de Vigo and (C) Ría de Pontevedra and (D) Ría de A Coruña.

lagoon ($0.0026\text{--}0.211 \mu\text{g L}^{-1}$), and one order of magnitude higher than levels listed in other locations such as Ría de Aveiro in Portugal ($0.001\text{--}0.035 \mu\text{g L}^{-1}$). Sampling areas near wastewater treatment plants (WWTP) contained higher levels of these compounds, which is the case of Singapur ($0.04\text{--}2.67 \mu\text{g L}^{-1}$). The levels reported in the literature were summarized in Table S2.

3.2. Ecological impact: risk quotient

The European Union guidelines employ the risk quotient (RQ), which is defined as the ratio of maximum measured environmental concentration (MEC) to the predicted no-effect concentration (PNEC), to evaluate ecological risk (EU, 1994). Low risk to the environment is considered when RQ value is below 0.1; medium risk if RQ is from 0.1 to 1 and high risk when this value is greater than 1 (Blair et al., 2013).

PNEC values are normally computed by dividing the lowest toxicity value observed with the most sensitive species by an assessment factor based on eco-toxicity data which can vary according to experimental situations (Yu et al., 2013).

In this case, the RQ values were calculated using the lowest PNECs values found in some published literature

($\text{PNEC}_{\text{BPA, *Oncorhynchus mykiss*}}: 0.15 \mu\text{g L}^{-1}$ (EU, 2002); $\text{PNEC}_{4\text{-OP, *Oncorhynchus mykiss*}}: 0.122 \mu\text{g L}^{-1}$ (EC, 2005b); $\text{PNEC}_{4\text{-NP, *Scenedesmus subspicatus*}}: 0.33 \mu\text{g L}^{-1}$ (EC, 2005a)).

The RQs were estimated using the maximum concentration of each compound in the five estuaries (Fig. 2). Low and medium ecological risk was determined in almost all the studied zones. However, higher risk for NP and BPA was detected in samples VS31 and PS11, respectively. WWTP and industrial discharges seemed to be the main sources of contamination; consequently, these areas should be controlled in the future. On the other hand, these results evidenced that BPA could be considered as a future priority substance, which is not prioritized in the recent water Directive 2013/39/EU.

3.3. EDCs exposure in the studied area

3.3.1. Effects on biota: Contribution of the target compounds to the estrogenic activity of water samples

The possible endocrine effects on the biota of the studied area could be estimated using the estrogenic potency of waters associated to the target analytes. Due to the fact that pollutants can act additively or have antagonistic or other interactive effects by

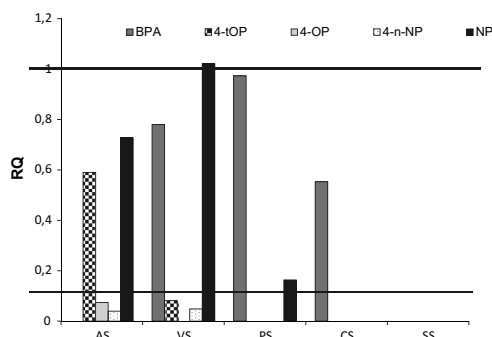


Fig. 2. Risk quotient of the five estuaries taking into account the maximum level of concentration: AS (Ría de Arousa), VS (Ría de Vigo), PS (Ría de Pontevedra), CS (Ría de A Coruña) and SS (Bay of Biscay, Santander).

operating at different points in cell signalling system (Salgueiro-González et al., 2013), mixtures of pollutants should be considered.

Estrogenic activity is normally calculated in terms of estradiol equivalent (EEQ_i) concentrations by employing the following equations, taking into account the estradiol equivalent factors (EEFs) listed in Table 2:

$$EEQ_i = C_i \times EEF_i \text{ and } EEQ_t = \sum EEQ_i$$

where i refers to the compound i with concentration C and EEQ_i is the total EEQ concentration. These equations were applied to four investigated estuaries (Santander/Bay of Biscay was discarded because of absence of the target compounds) and the total EEQ were compared. For calculations, the estrogenic potential of each sample within the same area was averaged. The contribution of each compound to the total estrogenic activity calculated in each area was also shown in Table 2.

The obtained EEQ values presented significant differences between areas. Whereas Ría de A Coruña and Ría de Pontevedra showed low levels ($<0.02 \text{ ng L}^{-1}$), higher values (more than ten times) were observed in Ría de Arousa and Ría de Vigo. Furthermore, BPA was the main contributor in Ría de A Coruña and Ría de Pontevedra while APs (especially NP) were the compounds that contributed the most to the total estrogenic potential in the other areas.

As it was shown in literature, based on both laboratory and field investigations, when EEQs values were in the $2.5\text{--}10 \text{ ng L}^{-1}$ range, an increase of plasma vitellogenin levels can occur in fish; meanwhile, if EEQs ranging between 10 and 100 ng L^{-1} , a decrease of testicular growth can be observed (Pojana et al., 2004). In all the

studied areas, the obtained EEQs were three orders of magnitude lower than the mentioned values. Therefore, the mixture of studied compounds in the analyzed water samples does not seem to induce biological effects at the concentrations measured in the samples.

3.3.2. Human health impact: daily intake estimations

As a preliminary approach and in order to obtain a first draw about the human health impact of these pollutants, the possible risk to the health of the inhabitants of the studied area as a consequence of ingestion of aquatic organisms was evaluated. To achieve this objective, daily intake of the target EDCs for fish and mussels was estimated, taking the levels of the target compounds in water mentioned before as a starting point.

At first, levels of concentration of APs and BPA in these different organisms was gauged using the bioaccumulation factor (BCF) according to the following equation:

$$C_{\text{organisms}} = \text{BCF} \times C_{\text{water}}$$

where C_{water} is the average concentrations measured in each area for each compound calculated following Directive 2009/90/EC requirements (COM, 2009). These average concentrations were calculated considering all the analyzed samples, thus also the negative samples (in which concentration of a compound was $<\text{MQL}$) for which the half of the MQL was considered for the calculations. The BCF and $C_{\text{organisms}}$ values were shown in Table S3.

Daily intakes (DI) of the target analytes for biota were calculated by means of the daily consumption ($\mu\text{g d}^{-1}$) and the levels of APs and BPA estimated in fish and mussel samples (ng g^{-1}). Daily consumption values (Fig. 3a) were listed in a European Food Safety Authority (EFSA) database (EFSA, 2011) based on surveys about the eating habits of people from European countries, including Spain. Toddlers (1–3 years), other children (4–12 years), adolescents (12–18 years) and adults (more than 18 years) were taken into account in this study.

The obtained DIs for fish were represented in Fig. 3b; as it can be seen, these values were lower than $2 \mu\text{g kg person}^{-1} \text{ d}^{-1}$ for all compounds except for NP, where DIs higher than $5 \mu\text{g kg person}^{-1} \text{ d}^{-1}$ were estimated. From the detected concentration, the highest DIs were estimated for Ría de Arousa and Ría de Vigo.

For mussels (Fig. 3c), the estimated DIs were again lower than $2 \mu\text{g kg person}^{-1} \text{ d}^{-1}$ for all compounds except for NP. In this case, values between 2 and $11 \mu\text{g kg person}^{-1} \text{ d}^{-1}$ were obtained. The maximum levels ($6\text{--}11 \mu\text{g kg person}^{-1} \text{ d}^{-1}$) were found in Ría de Arousa. This difference can be explained considering BCF values, which are higher for mussels than for fish.

Different European Agencies set tolerable daily intake (TDI) for the analyzed EDCs. Danish Institute of Safety and Toxicology proposed a TDI for NP ($5 \mu\text{g kg person}^{-1} \text{ d}^{-1}$) and 4-tOP ($10 \mu\text{g kg person}^{-1} \text{ d}^{-1}$) according to toxicological studies (Ferrara et al.,

Table 2
Estrogenic activity of waters (ng L^{-1}) measured in the studied estuaries.

Compound	EEF	Ría de Arousa		Ría de Vigo		Ría de Pontevedra		Ría de A Coruña	
		EEQ _i	%	EEQ _i	%	EEQ _i	%	EEQ _i	%
4-tOP	1.9E–005 ^b	5.1E–005	0.07	3.3E–006	–	–	–	–	–
4-OP	4.5E–006 ^b	–	–	–	–	–	–	–	–
4-n-NP	1.8E–007 ^b	–	–	1.9E–007	–	–	–	–	–
NP	9E–004 ^a	7.5E–002	99.93	6.5E–002	95.7	4.8E–006	27	–	–
BPA	6E–004 ^a	–	–	3.3E–003	4.3	1.3E–005	73	6.3E–003	100
EEQ _t (ng L^{-1})		0.076		0.066		0.017		0.006	

Estradiol equivalent factor (EEF).

Estradiol equivalent concentration (EEQ) and contribution of each compound to the estrogenic activity of the sample (in percent).

^a Salgueiro-González et al. (2013).

^b de Voogt and van Hattum (2003).

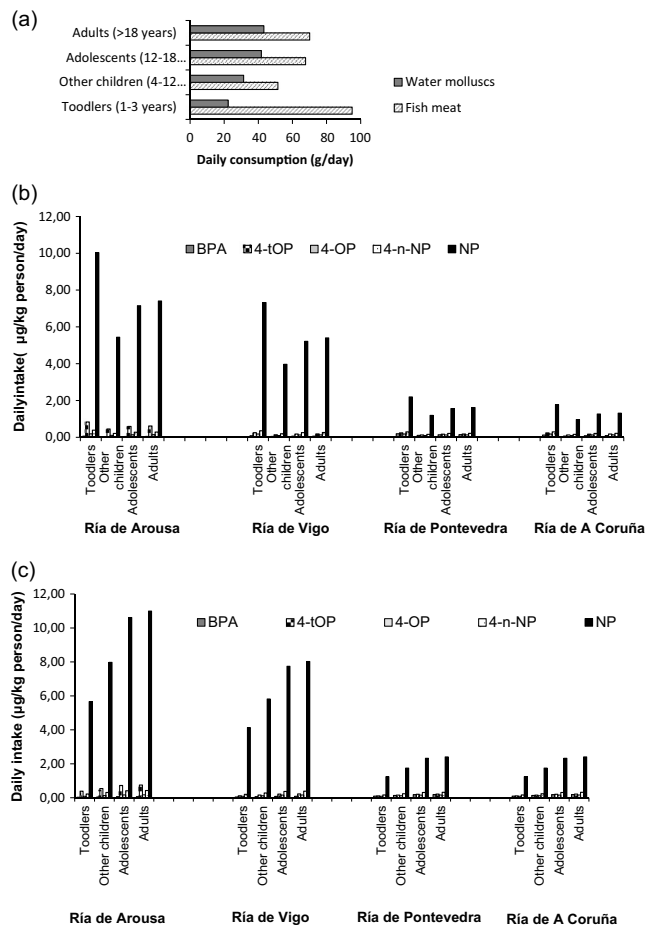


Fig. 3. Daily consumption (g d^{-1}) of fish meat and water molluscs by Spanish population (a). Estimated daily intakes ($\mu\text{g d}^{-1}$) of APs and BPA for fish (b) and mussels (c) in population of the studied areas.

2008). Meanwhile, EFSA established a TDI of $50 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ person}^{-1} \text{ d}^{-1}$ for BPA (<http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/bisphenol.html>). In all cases, the DI here obtained was one to three orders of magnitude lower than the proposed TDI. Hence, contamination of coastal waters by APs and BPA is not expected to have consequences on the health of its inhabitants in terms of ingestion of aquatic organisms. However, complementary studies should be carried out in the future in order to support these conclusions about human health impacts. Moreover, other exposure routes to these EDCs via ingestion of water, dust and air, and skin contact, can add up and has to be also considered (Salgueiro-González et al., 2013).

4. Conclusions

Levels and spatial distribution of APs and BPA in waters from five estuaries of the Northwest coast of Spain were determined. In four of them (Galician coast), almost all compounds were detected while no compounds were measured in Santander/Bay of Biscay.

NP was the predominant compound with maximal concentration of $0.337 \mu\text{g L}^{-1}$. However, the EQS for 4-tOP established in Directive 2013/39/UE ($0.01 \mu\text{g L}^{-1}$) was exceeded in all positive samples (16%). Whereas 4-n-NP was measured in seven samples ($<0.016 \mu\text{g L}^{-1}$), 4-n-OP was detected in only one ($0.009 \mu\text{g L}^{-1}$). In the case of BPA, six positives samples were found at levels between 0.022 and $0.146 \mu\text{g L}^{-1}$.

The spatial distribution of the compounds indicated that tourism, aquaculture activities, ship traffic and cleaning and other chemical products using in the maintenance of boats could be considered the main sources of contamination.

The ecological impact was evaluated and low and medium risk to the environment was found in almost all samples. However, risk quotient for BPA in Ría de Pontevedra and for NP in Ría de Vigo was close to the unit. Consequently, these areas should be controlled in the future. Furthermore, and according to our results, BPA could be reconsidered as a "future priority substance", as it was established by Directive 2008/105/EC.

Possible endocrine effects on biota of studied regions were also estimated and NP and BPA were found to be the main contributors

to the estrogenic activity of waters. The obtained EEQs do not seem to induce biological effects on the aquatic organisms.

Regarding the possible human health impact, a preliminary study based on the estimation of the risk to population for ingestion of aquatic organisms (fish and mussels) was evaluated and no risk was found in these areas.

Acknowledgements

This work has been supported by Xunta de Galicia (Program of Consolidation and Structuring of Units of Competitive Investigation of the University System of Galicia – GRC2013-047) and the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (CTM2013-48194-C3-2-R) both cofinanced by ERDF. Authors thank the staff Project 1-ESMAROS at Instituto Español de Oceanografía for their cooperation (Agreement IEO-MAGRAMA-2010/2012). N.Salgueiro acknowledges Xunta de Galicia and Campus do Mar, International Campus of Excellence, for the Ph.D Grant.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.12.062>.

References

- <http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/bisphenol.html>.
- Ahn, Y.G., Shin, J.H., Kim, H.Y., Khim, J., Lee, M.K., Hong, J., 2007. Application of solid-phase extraction coupled with freezing-lipid filtration clean-up for the determination of endocrine-disrupting phenols in fish. *Anal. Chim. Acta* 603, 67–75.
- Arditsoglou, A., Voutsas, D., 2012. Occurrence and partitioning of endocrine-disrupting compounds in the marine environment of Thermaikos Gulf, Northern Aegean Sea, Greece. *Mar. Pollut. Bull.* 64, 2443–2452.
- Besada, V., Andrade, J.M., Schultze, F., Fumega, J., Cambeiro, B., González, J.J., 2008. Statistical comparison of trace metal concentrations in wild mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in selected sites of Galicia and Gulf of Biscay (Spain). *J. Mar. Syst.* 72, 320–331.
- Blair, B.D., Crago, J.P., Hedman, C.J., Klaper, R.D., 2013. Pharmaceuticals and personal care products found in the Great Lakes above concentrations of environmental concern. *Chemosphere* 93, 2116–2123.
- COM, 2009. Commission Directive 2009/90/EC of 31 July 2009 laying down, pursuant to Directive 200/60/EC of the European Parliament and of the Council, technical specifications for chemical analysis and monitoring of water status.
- de Voogt, P., van Hattum, B., 2003. Critical factors in exposure modeling of endocrine active substances. *Pure Appl. Chem.* 75, 1933–1948.
- Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J.-P., Giudice, L.C., Hauser, R., Prins, G.S., Soto, A.M., Zoeller, R.T., Gore, A.C., 2009. Endocrine-disrupting chemicals: an endocrine society scientific statement. *Endocr. Rev.* 30, 293–342.
- Directive, 2000. Directive 2000/60/EC of the Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy.
- Directive, 2008a. Directive 2008/56/EC of the European Parliament and of the Council of 17 June 2008 establishing a framework for community action in the field of marine environmental policy (Marine Strategy Framework Directive).
- Directive, 2008b. Directive 2008/105/EC of Parliament and of the Council of 16 December 2008 on environmental quality standards in the field of water policy, amending and subsequently repealing Council Directives 82/176/EEC, 83/513/EEC, 84/156/EEC, 84/491/EEC, 86/280/EEC and amending Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council.
- Directive, 2011. Commission Directive 2011/2/EU of January 2011 amending Directive 2002/72/EC as regards the restriction of use Bisphenol A in plastic infant feeding bottles.
- Directive, 2013. Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council of 12 August 2013 amending Directives 2000/60/EC as regards priority substances in the field of water policy.
- EC, 2005a. Common Implementation Strategy for the Water Framework Directive. Environmental Quality Standards (EQS). Substance Data sheet (24): Nonylphenols and 4-Nonylphenols.
- EC, 2005b. Common Implementation Strategy for the Water Framework Directive. Environmental Quality Standards (EQS). Substance Data sheet (25): Octylphenols (para-tert-octylphenols).
- EFSA, 2011. Comprehensive Food Consumption Database. European Food Safety Authority.
- EU, 1994. EU ad Hoc Working Party, III/5504/94. Draft 4. Assessment of potential risk is to the environment posed by medicinal products for human use, excluding products containing live genetically modified organisms.
- EU, 1999. Community Strategy for Endocrine Disruptors – a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife. COM, 706.
- EU, 2002. Updated European union risk assessment report 4,4'-Isopropylidenediphenol (bisphenolA). EUR 24588EN.
- Ferguson, P.L., Iden, C.R., Brownawell, B.J., 2001. Distribution and fate of neutral alkylphenol ethoxylate metabolites in a sewage-impacted urban estuary. *Environ. Sci. Technol.* 35, 2428–2435.
- Ferrara, F., Ademollo, N., Delise, M., Fabietti, F., Funari, E., 2008. Alkylphenols and their ethoxylates in seafood from the Tyrrhenian Sea. *Chemosphere* 72, 1279–1285.
- Pojana, G., Bonfa, A., Busetti, F., Collarin, A., Marcomini, A., 2004. Estrogenic potential of the Venice, Italy, lagoon waters. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 1874–1880.
- Quelle, C., Besada, V., Andrade, J.M., Gutierrez, N., Schultze, F., Gago, J., Jose Gonzalez, J., 2011. Chemometric tools to evaluate the spatial distribution of trace metals in surface sediments of two Spanish rias. *Talanta* 87, 197–209.
- Salgueiro-González, N., Concha-Graña, E., Turnes-Carou, I., Muniategui-Lorenzo, S., Lopez-Mahia, P., Prada-Rodríguez, D., 2012a. Blank and sample handling troubleshooting in ultratrace analysis of alkylphenols and bisphenol A by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Talanta* 101, 413–419.
- Salgueiro-González, N., Concha-Graña, E., Turnes-Carou, I., Muniategui-Lorenzo, S., López-Mahía, P., Prada-Rodríguez, D., 2012b. Determination of alkylphenols and bisphenol A in seawater samples by dispersive liquid–liquid microextraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry for compliance with Environmental quality standards (Directive 2008/105/EC). *J. Chromatogr. A* 1223, 1–8.
- Salgueiro-González, N., Lopez de Alda, M., Muniategui-Lorenzo, S., Prada-Rodríguez, D., Barcelo, D., 2013. Determination of 13 estrogenic endocrine disrupting compounds in atmospheric particulate matter by pressurised liquid extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 405, 8913–8923.
- Sánchez-Avila, J., Fernandez-Sanjuan, M., Vicente, J., Lacorte, S., 2011. Development of a multi-residue method for the determination of organic micropollutants in water, sediment and mussels using gas chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1218, 6799.
- Venisse, N., Grignon, C., Brunet, B., Thévenot, S., Bacle, A., Migeot, V., Dupuis, A., 2014. Reliable quantification of bisphenol A and its chlorinated derivatives in human urine using UPLC–MS/MS method. *Talanta*.
- WHO, 2012. State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals. 2012. Summary for Decision-Makers.
- Wright-Walters, M., Volz, C., Talbott, E., Davis, D., 2011. An updated weight of evidence approach to the aquatic hazard assessment of Bisphenol A and the derivation a new predicted no effect concentration (Pnec) using a non-parametric methodology. *Sci. Total Environ.* 409, 676–685.
- Yu, Y., Wu, L., Chang, A.C., 2013. Seasonal variation of endocrine disrupting compounds, pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment plants. *Sci. Total Environ.* 442, 310–316.

Supplementary Material

OCCURRENCE OF ENDOCRINE DISRUPTING COMPOUNDS IN FIVE ESTUARIES OF THE NORTHWEST COAST OF SPAIN: ECOLOGICAL AND HUMAN HEALTH IMPACT

N. Salgueiro-González^a, I. Turnes-Carou^a, L. Viñas-Diéguez^b, S. Muniategui-Lorenzo^{a*},
P. López-Mahía^a, D. Prada-Rodríguez^a,

^a. Grupo Química Analítica Aplicada (QANAP), Instituto Universitario de Medio Ambiente (IUMA), Departamento de Química Analítica, Facultade de Ciencias, Universidade da Coruña, Campus de A Coruña, E-15071 A Coruña, Spain.

^b. Centro Oceanográfico de Vigo, Instituto Español de Oceanografía, IEO, Subida a Radio Faro, 50, 36390, Vigo, Spain.

Nº of pages: 13

Tables: 2

Figures: 2 (6)

Chemicals and reagents

Nonylphenol technical mixture (NP) 94% purity ($\pm 1\%$ tolerance) and 4-*n*-nonylphenol (4-*n*-NP) 99.9% purity ($\pm 0.5\%$ tolerance) were from Riedel-de Haën (Seelze, Germany). BPA 99% purity ($\pm 0.5\%$ tolerance), 4-*tert*-octylphenol (4-tOP) 97% purity ($\pm 0.5\%$ tolerance) and 4-*n*-octylphenol (4-*n*-OP) 99% purity ($\pm 0.5\%$ tolerance) were obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). As deuterated surrogate internal standards, 4-*n*-nonylphenol-2,3,5,6- d_4 (4-*n*-NP- d_4) 99.3% was obtained from CDN Isotopes (Pointe-Claire, Canada) and solution of bisphenol A- d_{16} (BPA- d_{16}) 99.5% in acetonitrile (100 mg L⁻¹) was from Dr. Ehrenstorfer GMBH (Augsburg, Germany). For the extraction, 1-Octanol Chromasolv® (grade HPLC 99%) was from Sigma-Aldrich Co. (Madrid, Spain). For the determination, methanol LC-MS PAI and ammonia (30%) for instrumental analysis were from Panreac (Barcelona, Spain). Ultrapure water was purified with a Direct 5 Milli Q system (Millipore, Bedford, MA, USA).

Sample preparation and analytical determination. QA/QC

Briefly, after homogenization, an aliquot of 30 mL of seawater transferred to a 50 mL centrifuge tube. Samples were not filtrated prior to analysis; consequently, adsorbed and water dissolved analytes were considered. The deuterated surrogate internal standards (4-*n*-NP- d_4 was used for APs whereas BPA- d_{16} was employed in the analysis of BPA) were added to the samples followed by 100 μ L of 1-octanol. The mixture was vigorously shaken during 5 minutes at 1200 rpm and then separated upon centrifugation (3500 rpm, 3 min). The fine droplets of 1-octanol were collected and up to 1 mL with methanol and filtered (PTFE, 0.2 μ m) before LC injection.

LC determination was performed using an Agilent HP-1200 Series LC system coupled to a mass spectrometer with a triple quadrupole detector and an APCI/ESI source (API 3200, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Multiple-reaction monitoring (MRM) were registered for each analyte, which provides four identification points (one precursor ion and two products ions), according to the Decision 2002/657/EC [2002]. Furthermore, the relation between the transitions (MRM ratio) was also used as a criterion for the identification in sample analysis. Deuterated surrogate standards were used for the quantitation in order to correct matrix effect.

Blank, spiked (levels from 0.05 to 0.5 μ g L⁻¹) and parallel samples were performed during each batch of analysis. For the spiked samples, relative recoveries varied from 90% to 105%. All procedural blanks were far below that previously established method quantitation limits (MQL) which were set as $X_b + 10SD_b$ (X_b average and SD_b standard deviation of the seven blank seawater samples from pristine areas) [Salgueiro-González *y cols.*, 2012]. As it can be seen in Table S1 (Supplementary Material), the obtained MQL allowed the determination of APs at the levels established by the legislation (Directive 2013/39/EU); moreover, in the case of nonylphenols (4-*n*-NP and NP) the MQL was lower than the 30% of the EQS, which is requested by Directive 2009/90/EC [COM, 2009].

Table S1. Method Quantitation Limits (MQLs) experimentally verified, together precision (RSD%) and recoveries (R%). Environmental Quality Standards sets in Directive 2013/39/EU for each compound

Compound	Experimental MQL			Directive values	
	MQL ($\mu\text{g L}^{-1}$)	RSD%	R%	AA ($\mu\text{g L}^{-1}$)	MAC ($\mu\text{g L}^{-1}$)
4-tOP	0.008	19	108	0.01	Not applicable
4- <i>n</i> -OP	0.006	10	95	0.01	Not applicable
4- <i>n</i> -NP	0.005	15	90	0.3	2
NP	0.030	9	104	0.3	2
BPA	0.020	9	100	-	-

Table S2. Levels of APs and BPA ($\mu\text{g L}^{-1}$) in coastal waters found in the literature

Location	Concentration ($\mu\text{g L}^{-1}$)					Ref
	4-tOP	4- <i>n</i> -OP	4- <i>n</i> -NP	NP	BPA	
Ría Aveiro (Portugal)	0.001	NA	NA	0.0015-0.035	<0.01	[Jonkers <i>y cols.</i> , 2010]
Mediterranean coast (Spain)	<0.1-0.3	NA	NA	<0.15-2.7	<0.1	[Petrovic <i>y cols.</i> , 2001]
Cataluña (Spain)	<0.038	NA	NA	0.079-0.521	0.007-0.035	[Sánchez-Avila <i>y cols.</i> , 2011]
Singapur	<1.06	0.05-0.19	NA	0.3-2.67	0.04-0.19	[Basheer <i>y cols.</i> , 2004]
Jamaica	<0.008	NA	NA	0.077-0.420	NA	[Ferguson <i>y cols.</i> , 2001]
Venice lagoon	NA	NA	NA	<0.0005-0.211	<0.146	[Pojana <i>y cols.</i> , 2007]
Masan Bay (Korea)	NA	NA	NA	0.0097-0.0471	NA	[Li <i>y cols.</i> , 2008]
Thermaikos Gulf (Greece)	<0.018	<0.007	NA	0.022-0.201	0.0106-0.053	[Arditsoglou <i>y cols.</i> , 2012]
Daliao River Estuary (China)	<0.0047	NA	NA	0.084-0.777	0.0038-0.107	[Li <i>y cols.</i> , 2013]
Gernika estuarine (Bay of Biscay)	<0.05	<0.04	NA	196	56	[Iparraguirre <i>y cols.</i> , 2012]
Cantanbrian coast (Spain)	0.6-113	NA	NA	1.9-385	1.6-15	[Sanchez-Avila <i>y cols.</i> , 2013]
Santos Bay (Brazil)	<0.013	0.019-134	<0.004	NA	<0.003-76.8	[Lisboa <i>y cols.</i> , 2013]
Five estuaries (NW Spain)	<0.072	<0.009	<0.0016	<0.03-0.337	<0.02-0.146	This work

NA:Not analyzed

Table S3. Bioaccumulation factors (BCF) and estimated concentrations of APs and BPA in aquatic organisms (ng g⁻¹) of the studied area.

Aquatic Organism	Analytes	BCF	Concentration (ng g ⁻¹)			
			Ría de Arousa	Ría de Vigo	Ría de Pontevedra	Ría de A Coruña
Fish	4-tOP	634 ^a	8.8	2.6	2.5	4.6
	4-n-OP	634 ^a	2.0	1.9	1.9	1.9
	4-n-NP	1248 ^b	4.1	3.7	3.1	3.7
	NP	1248 ^b	106	77.1	23.1	68.6
	BPA	68 ^c	0.68	0.93	2.0	1.3
Mussels	4-tOP	1250 ^d	17.3	5.2	5.0	5.0
	4-n-OP	1250 ^d	3.9	3.7	3.7	3.7
	4-n-NP	3000 ^b	9.9	9.0	7.5	8.8
	NP	3000 ^b	254	185	55.6	165
	BPA	144 ^c	1.4	1.9	4.3	2.8

^a[EC, 2005b]

^b[EC, 2005a]

^c[Flint *y cols.*, 2012]

^d[Arditsoglou *y cols.*, 2012]

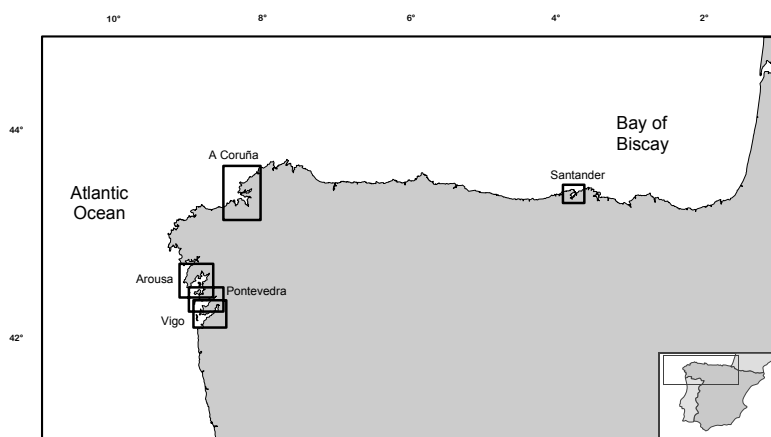
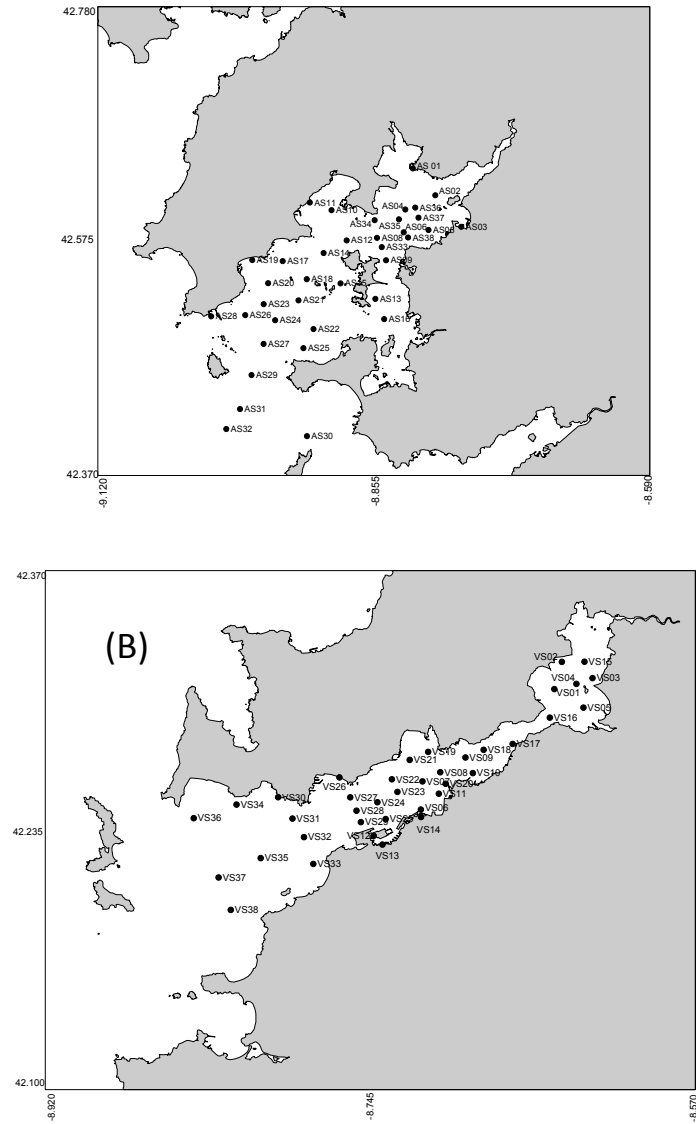
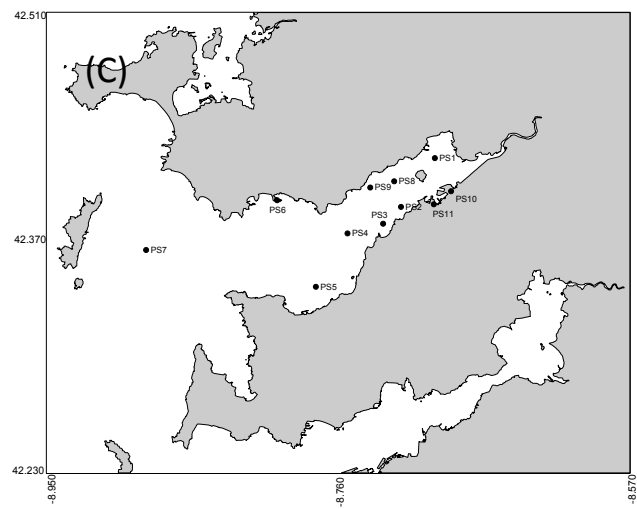
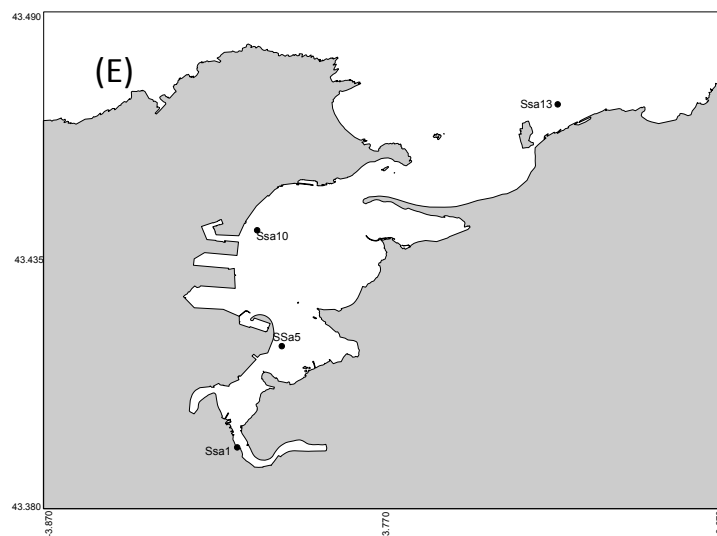


Figure S1. Location of the sampling area.

Figure S2. Sampling points of the studied regions: (a) Ría de Arousa; (b) Ría de Vigo; (c) Ría de Pontevedra; (d) Ría de A Coruña; (e) Bay of Biscay (Santander)







REFERENCES

- Commission Decision (2002/657/EC): implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results.
- Arditsoglou, A., Voutsas, D. *Occurrence and partitioning of endocrine-disrupting compounds in the marine environment of Thermaikos Gulf, Northern Aegean Sea, Greece*, Mar. Pollut. Bull. (2012) 64, 2443-2452.
- Basheer, C., Lee, H.K. *Analysis of endocrine disrupting alkylphenols, chlorophenols and bisphenol A using hollow fiber-protected liquid-phase microextraction coupled with injection port-derivatization gas chromatography-mass spectrometry*, J. Chromatogr. A (2004) 1057, 163-169.
- Commision Directive 2009/90/EC of 31 July 2009 laying down, pursuant to Directive 200/60/EC of the European Parliament and of the Council, technical specifications for chemical analysis and monitoring of water status.
- Common Implementation Strategy for the Water Framework Directive. Environmental Quality Standards (EQS). Substance Data sheet (24): Nonylphenols and 4- Nonylphenols.
- Common Implementation Strategy for the Water Framework Directive. Environmental Quality Standards (EQS). Substance Data sheet (25): Octylphenols (para-tert-octylphenols).
- Ferguson, P.L., Iden, C.R., Brownawell, B.J. *Distribution and fate of neutral alkylphenol ethoxylate metabolites in a sewage-impacted urban estuary*, Environ. Sci. Technol. (2001) 35, 2428-2435.
- Flint, S., Markle, T., Thompson, S., Wallace, E. *Bisphenol A exposure, effects, and policy: A wildlife perspective*, Journal of Environmental Management (2012) 104, 19-34.
- Iparraguirre, A., Navarro, P., Prieto, A., Rodil, R., Olivares, M., Fernandez, L.-A., Zuloaga, O. *Membrane-assisted solvent extraction coupled to large volume injection-gas chromatography-mass spectrometry for the determination of a variety of endocrine disrupting compounds in environmental water samples*, Anal. Bioanal. Chem. (2012) 402, 2897-2907.

- Jonkers, N., Sousa, A., Galante-Oliveira, S., Barroso, C., Kohler, H., Giger, W. *Ocurrence and sources of selected phenolic compounds disruptors in Ria de Aveiro, Portugal*, Environ. Sci. Pollut. Res. (2010) 17, 834-843.
- Li, D., Dong, M., Shim, W.J., Yim, U.H., Hong, S.H., Kannan, N. *Distribution characteristics of nonylphenolic chemicals in Masan Bay environments, Korea*, Chemosphere (2008) 71, 1162-1172.
- Li, J., Fu, J., Zhang, H., Li, Z., Ma, Y., Wu, M., Liu, X. *Spatial and seasonal variations of occurrences and concentrations of endocrine disrupting chemicals in unconfined and confined aquifers recharged by reclaimed water: A field study along the Chaobai River, Beijing*, Sci. Total Environ. (2013) 450, 162-168.
- Lisboa, N.S., Fahning, C.S., Cotrim, G., Dos Anjos, J.P., de Andrade, J.B., Hatje, V., da Rocha, G.O. *A simple and sensitive UFLC-fluorescence method for endocrine disrupters determination in marine waters*, Talanta (2013) 117, 168-75.
- Petrovic, M., Barcelo, D. *Determination of phenolic xenoestrogens in environmental samples by liquid chromatography with mass spectrometric detection*, J AOAC Int. (2001) 84, 1074-1085.
- Pojana, G., Gomiero, A., Jonkers, N., Marcomini, A. *Natural and synthetic endocrine disrupting compounds (EDCs) in water, sediment and biota of a coastal lagoon*, Environ Int (2007) 33, 929.
- Salgueiro-González, N., Concha-Graña, E., Turnes-Carou, I., Muniategui-Lorenzo, S., López-Mahía, P., Prada-Rodríguez, D. *Determination of alkylphenols and bisphenol A in seawater samples by dispersive liquid-liquid microextraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry for compliance with Environmental Quality Standards (Directive 2008/105/EC)*, J Chromatogr A (2012) 1223, 1-8.
- Sánchez-Avila, J., Fernandez-Sanjuan, M., Vicente, J., Lacorte, S. *Development of a multi-residue method for the determination of organic micropollutants in water, sediment and mussels using gas chromatography-tandem mass spectrometry*, J Chromatogr A (2011) 1218, 6799.
- Sanchez-Avila, J., Vicente, J., Echavarri-Erasun, B., Porte, C., Tauler, R., Lacorte, S. *Sources, fluxes and risk of organic micropollutants to the Cantabrian Sea (Spain)*, Mar. Pollut. Bull. (2013) 72, 119-132.

ANEXO VIII

Occurrence, distribution and bioaccumulation of
endocrine disrupting compounds in water, sediment
anf biota samples from a European river basin

Sci Total Environ, 529 (2015) 121-130



Contents lists available at ScienceDirect

Science of the Total Environment

journal homepage: www.elsevier.com/locate/scitotenv

Occurrence, distribution and bioaccumulation of endocrine disrupting compounds in water, sediment and biota samples from a European river basin



N. Salgueiro-González^a, I. Turnes-Carou^a, V. Besada^b, S. Muniategui-Lorenzo^{a,*},
P. López-Mahía^a, D. Prada-Rodríguez^a

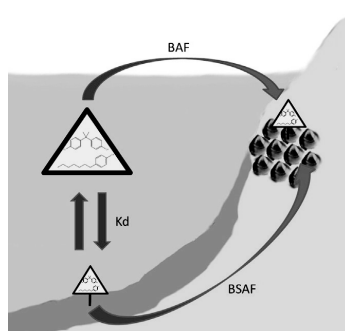
^a Grupo Química Analítica Aplicada (QANAP), Instituto Universitario de Medio Ambiente (IUMA), Centro de Investigaciones Científicas Avanzadas (CICA), Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias, Universidade da Coruña, Campus de A Coruña, E-15071 A Coruña, Spain

^b Instituto Español de Oceanografía, IEO, Centro Oceanográfico de Vigo, Subida a Radio Faro, 50, 36390 Vigo, Spain

HIGHLIGHTS

- Occurrence of 5 EDCs (APs and BPA) in water, sediment and biota from the Minho River
- Higher EDC concentrations in water were observed during the spring campaign.
- Low levels of EDCs measured in sediment and biota samples, except in the case of NP
- Bioaccumulation factors and sediment–water partition coefficients were estimated.
- Ecological and human health impacts were estimated and no risk was identified.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 March 2015

Received in revised form 13 May 2015

Accepted 13 May 2015

Available online xxxx

Editor: D. Barcelo

Keywords:

Alkylphenols

Bisphenol A

Minho River

Directive 2013/39/EU

Environmental quality assessment

Human health impact

ABSTRACT

The occurrence, distribution and bioaccumulation of five endocrine disrupting compounds (4-tert-octylphenol, 4-n-octylphenol, 4-n-nonylphenol, nonylphenol and bisphenol A) in water, sediment and biota (*Corbicula fluminea*) collected along the Minho River estuary (NW Iberian Peninsula) were examined. Samples were collected in two campaigns (May and November, 2012) and analyzed by different extraction procedures followed by liquid chromatography tandem mass spectrometry determination. The presence of linear isomers (4-n-octylphenol and 4-n-nonylphenol) was scarcely observed whereas branched isomers (4-tert-octylphenol and nonylphenol) were measured in almost all samples. Wastewater treatment plant effluents and nautical, fishing and agricultural activities are considered the primary source of pollution of the river by alkylphenols. The presence of bisphenol A in the river could be mainly associated to punctual sources of contamination from industrial discharges. A decrease in the total concentration of phenolic compounds in water was observed from spring to autumn (from 0.888 $\mu\text{g L}^{-1}$ in May to 0.05 $\mu\text{g L}^{-1}$ in November), while similar values were shown in *C. fluminea* samples from the two campaigns (1388 and 1228 ng g^{-1} dw in spring and autumn, respectively). In sediments, the total concentration of the target compounds varied between 13 and

* Corresponding author.

E-mail address: smuniat@udc.es (S. Muniategui-Lorenzo).

4536 ng g⁻¹ dw (average of 1041 ng g⁻¹ dw). Sediment–water partition coefficient (K_d), bioaccumulation factor (BAF) and biota–sediment accumulation factor (BSAF) were estimated and highest values were obtained for nonylphenol. Calculated risk quotients showed low and moderate risk for the aquatic environment from the presence of the target compounds at all sampling points. The estimation of the daily intake of the studied compounds via water and biota ingestion indicated no risk for human health.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The release of emerging organic pollutants into the environment has increased with the growing population, urbanization and modernization (Mohapatra et al., 2010). Due to the fact that a great number of contaminants derive from wastewater treatment plant and industrial discharges, aquatic environment is the most vulnerable ecosystem (Brix et al., 2010). In order to recover a good environmental quality of European water bodies and to protect human health, a set of improved European water policies lead by the Water Framework (WFD) (Directive, 2000), was implemented. The main objective of the WFD was the achievement of a “good ecological status” and a “good chemical status” of waters before 2015. Following WFD, daughter Directives (Directive, 2008, 2013), technical guidance (COM, 2011) and implementing strategies (COM, 2010) concerning the evaluation of the chemical status of aquatic ecosystems have been published. One of criteria for assessing a good chemical status of a water body is the compliance of priority substances and other pollutants with the corresponding Environmental Quality Standards (EQS) set in Directive 2013/39/EU (Directive, 2013), amending Directive 2000/60/EC and Directive 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy. These EQS are limit values derived for chemical substances that pose a significant acute and chronic risk to or via the aquatic environment (Palma et al., 2014). When the risk is related directly to the water column, with predators through the food chain or the benthic biota, EQS in water, biota and sediment are required. However, if a substance does not seem to pose a risk to a particular compartment, the corresponding EQS will not be necessary. Unfortunately, an inadequate decision could be taken for some emerging pollutants because of the absence of data. For this reason, new research about the occurrence, distribution and toxicology of emerging pollutants is required.

Almost all 45 priority substances listed in the 2013 Directive are endocrine disrupting compounds (EDCs). Alkylphenols (APs), a class of EDCs, are the degradation products of the non-ionic surfactants alkylphenol polyethoxylates (APEs), used as plasticizers in high density polyethylene (HDPE), polyethyleneterephthalate (PET) and polyvinylchloride (PVC) and also in the manufacture of textiles, paper and agricultural chemical products (Salgueiro-González et al., 2012a).

Another known important EDC is bisphenol A (BPA), used as a monomer for the production of epoxy resins, phenol resins, polycarbonates, polyesters and lacquer coatings for food cans (Ahn et al., 2007). Risk assessment models showed that aquatic system may be exposed to adverse effects of BPA at the current predicted no-effect concentration (PNEC) established values (1.6 µg L⁻¹ for freshwater) (EU, 2002). Moreover, due to possible toxicological effects of BPA on infant health, the use of this chemical in plastic feeding bottles intended for infants was restricted by Directive 2011/8/EU amending Directive 2002/72/EC (Directive, 2011).

The ubiquity of APs and BPA was demonstrated in different areas around the world in the last years. Almost all these studies were focused on the analysis of these EDCs in water (Cladiere et al., 2013; Fabregat-Cabello et al., 2013), sediment (Zhang et al., 2014; Z. Zhang et al., 2011) and biota (Jakimska et al., 2013). However, only a few studies on their occurrence in all the three compartments could be found in the literature (Klosterhaus et al., 2013; Pojana et al., 2007). Considering all the three compartments for the same area, very useful information about the distribution, accumulation and biomagnification of the target

analytes in the environment would be obtained. In addition, the main exposure routes in the aquatic system could be understood.

Our study focuses on the Minho River, which is located in the North-West of Iberian Peninsula and extends mainly over Galicia (NW Spain) with less than 5% of its area in northern Portugal. The Minho River is the most important river of Galicia region and takes the sixth position in the list of the Spanish rivers, according to its length and average flow. The main economic activity of the Minho basin is the production of electricity, but different industrial, domestic, agricultural and nautical activities carried out in the basin can affect its environmental quality (Mil-Homens et al., 2013). For all these reasons, the understanding of the occurrence of pollutants in this river ecosystem is a first step to find an adequate strategy for efficient water use and protection considering and balancing socio-economic and environmental aspects. Heavy-metal contamination was previously studied in the sediments of this area (Mil-Homens et al., 2013). To our knowledge, occurrence of the target EDCs in the Minho River has not been reported yet.

The aim of this paper is to assess the occurrence, distribution and bioaccumulation of five EDCs (BPA and APs) in the Minho River estuary. To achieve this objective, the presence of these pollutants in water, sediment and *Corbicula fluminea* of this European river basin was examined for the first time. Possible sources of anthropogenic contamination with the target compounds were also evaluated for the studied area, which is important information for the implementation of WFD and future pollution control measures in achieving a good chemical status of the water body. Finally, possible risks to aquatic organisms and public health associated to the studied pollutants were estimated in terms of their estrogenic activity and daily intake, respectively. The results of the study are valuable for establishing the EQS for these analytes in sediment and biota. Furthermore, although the research was focused in the Minho River, its conclusions could be extrapolated to other locations with similar conditions.

2. Materials and methods

2.1. Materials and standards

Nonylphenol technical mixture (NP) 94% ± 1% purity (CAS number: 84852-15-3) and 4-*n*-nonylphenol (4-*n*-NP) 99.9% ± 0.5% purity (CAS number: 104-40-5) were purchased from Riedel-de Haën (Seelze, Germany). Bisphenol A (BPA) 99% ± 0.5% purity (CAS number: 80-05-7), 4-*tert*-octylphenol (4-*t*-OP) 97% ± 0.5% purity (CAS number: 140-66-9) and 4-*n*-octylphenol (4-*n*-OP) 99% ± 0.5% purity (CAS number: 1806-26-4) were obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). All standard solutions (1000, 10 and 1 mg L⁻¹) containing all the compounds were prepared in methanol (SPS grade) from Romil Ltd. (Cambridge, United Kingdom) and stored at 4 °C. As surrogate internal standards, 4-*n*-nonylphenol-2,3,5,6-*d*₄ (NP-*d*₄) 99.3% (CAS number: 358730-95-7) was obtained from CDN Isotopes (Pointe-Claire, Canada) and solution of bisphenol A-*d*₁₆ (BPA-*d*₁₆) 99.5% (CAS number: 96210-87-6) in acetonitrile (100 mg L⁻¹) was from Dr. Ehrenstorfer GMBH (Augsburg, Germany).

For the extraction of water samples, 1-Octanol Chromasolv® (grade HPLC 99%) was from Sigma-Aldrich Co. (Madrid, Spain). Meanwhile, for the analysis of solid samples, methanol Super Purity from Romil (Cambridge, UK) was used. Furthermore, basic and

neutral alumina activity grade I and octadecyl functionalized silica gel (C18) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA).

For the determination, methanol LC–MS grade and ammonia (30%) for instrumental analysis were from Panreac (Barcelona, Spain). Ultrapure water was purified with a Direct 5 Milli Q system (Millipore, Bedford, MA, USA).

2.2. Study area and sample collection

The Minho River (about 300 km long and 17,100 km² watersheds) originates in Serra da Meira (Lugo, Spain) and reaches the Atlantic Ocean near Caminha (Portugal) and La Guardia (Spain). This European river defines the frontier between Spain and Portugal in the last 75 km, and this study is focused on this international river stretch. Different towns and municipalities such as Caminha, Cerveira, Valença (Portugal), A Guarda, O Rosal, Tomiño and Tui (Spain) are located in this area, with an average population density of 206 inhabitants/km² (Vale et al., 2014). The River has a freshwater discharge generally between 127 m³ s^{−1} to 500 m³ s^{−1}, with a mean value of 300 m³ s^{−1} (<http://snirh.apambiente.pt/>). Fig. 1 shows the Minho River with its main tributaries, Louro, Coura and Tamuxe.

The Minho River estuary (about 40 km) is partially mixed with a tidal freshwater portion of nearly 30 km. However, during periods of high flood, it tends to develop towards a salt estuary (Sousa et al., 2008a). The morphological and salinity attributes were combined to identify the four water bodies (WB1, WB2, WB3 and WB4) common to Spain and Portugal under the Water Framework Directive (Fig. S1, Supplementary material). The length of the longitudinal axis of each

WB is: 2.6 km (WB1), 5.4 km (WB2), 13.5 km (WB3) and 15.6 km (WB4) (Vale et al., 2014).

In the frame of the project TEAM-Miño (POCTEP 2007–2013) (<http://www.team-minho.eu>), two sampling campaigns were carried out at the Minho River: in 21–25th, May (spring season) and in 26–30th, November (autumn season) of 2012. At the sampling station 015 located in Salvaterra do Miño (<http://www.chminosil.es/es/>), the Minho River average flow rate was 200 m³ s^{−1} during the first campaign, while it was 365 m³ s^{−1} (average) during the second campaign. Increased flow rate in autumn season could be explained by the higher rainfall registered, in comparison to spring season (4 and 17 mm in May and November, respectively). Water, sediment and *C. fluminea* samples were collected at different sampling points (Fig. 1), which have been chosen according to previous studies in this area and to the proximity of possible sources of pollution with the target compounds.

A total of thirteen water samples were taken near surface and river bottom at eight sampling points during the two campaigns (May and November, 2012). At five sampling points located in the Minho riverbed, two samples per point were collected during each campaign representing high tide (ht) and low tide (lt) in order to understand the influence of the tidal change. The other three points corresponded to the tributaries Louro, Coura and Tamuxe (Fig. 1). Water column parameters such as temperature (T), conductivity (CND), total dissolved solids (TDS), pH, salinity (S) and dissolved oxygen (DO) were measured using a portable multi-parametrical sensor (Table S1, Supplementary material).

The sampling of water was carried out using adequately pre-cleaned glass containers (2 L) and the collected samples were stored refrigerated at 4 °C until the analysis. Due to the low stability of APs and BPA

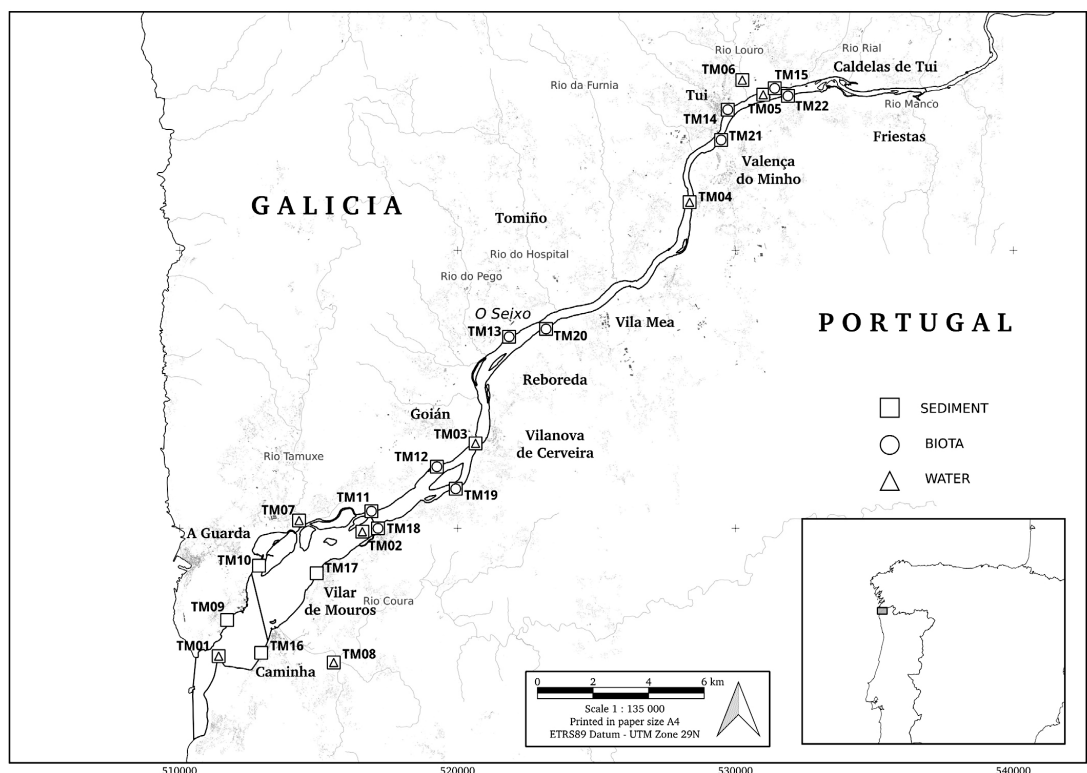


Fig. 1. Map of the study area. Location of water, sediment and biota sampling points.

(Salgueiro-González et al., 2012a), samples were analyzed within five days of their sampling.

Surface sediment samples (0–4 cm of depth) were collected using Van-Veen Grab at 22 sampling points (one sample per point) during the spring campaign (May 2012). Prior to EDC analysis, samples were frozen at -20°C , then freeze-dried, homogenized and sieved through a 2 mm mesh in the laboratory. The fraction below 0.063 mm was determined in order to characterize the sediment and facilitate data assessment (Table S2, Supplementary material).

Biota samples were collected at 11 sampling points (one sample per point) in the two campaigns. An invasive molluscan species *C. fluminea* was chosen for the study because it is the predominant species among the molluscan fauna of the River estuary freshwater subtidal area (Sousa et al., 2008b; Ilarri et al., 2014). Analyses were made in pools of soft tissue (more than 20 individuals), representing all sizes present at the sampling points. After removing the shell, clams were lyophilized and stored at -20°C .

2.3. Sample preparation and analysis

Samples were analyzed by novel and environmental friendly methodologies (according to Green Chemistry principles) previously published by Salgueiro-González et al. (2012b,c, 2014). Briefly, water samples (30 mL) were extracted by dispersive liquid–liquid micro-extraction (DLLME) with 100 μL of 1-octanol. The mixture was vigorously shaken during 5 min and separated upon centrifugation. The fine droplets of 1-octanol were collected and up to 1 mL with methanol and filtered before LC injection. Isotope-labeled surrogate standards were added to the samples before extraction in order to compensate matrix effects. Sediment samples (0.5 g of freeze-dried sediment samples) were extracted by selective pressurized liquid extraction (SPLE) in the following conditions: methanol as extraction solvent, temperature of 150°C , pressure of 1500 psi, 2 g of basic alumina as a clean-up sorbent and C18 as a dispersant agent. The same technique was used for the extraction of biota samples (0.5 g of freeze-dried clam samples) but the extraction was carried out at the temperature of 40°C and using 3 g of neutral alumina as a clean-up sorbent. In both cases, SPLE extracts were concentrated and reconstituted to a 1 mL volume with methanol before the instrumental analysis. In the case of solid samples, standard addition curves were used to ensure a reliable quantitation of the target compounds.

All the prepared samples were analyzed by LC–MS/MS using an Agilent HP-1200 Series LC system coupled to a mass spectrometer with a triple tandem quadrupole detector and an APCI/ESI source (API 3200, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Multiple-reaction monitoring (MRM) was chosen as an acquisition mode because of its high sensitivity and selectivity. A system of identification points set by Directive 96/23/EC and Decision 2002/657/EC was used to interpret the data: four points were earned using one precursor ion and two products ions of each analyte. A more abundant transition of each analyte was used for the quantitation, and the ratio of ion abundances (MRM transitions ratio), as well as their chromatographic retention times were used for the identification and confirmation purposes in the sample analyses. Deuterated standards were used for the quantitation in order to correct matrix effect: NP- d_4 was used for the analysis of APs and BPA- d_{16} for the analysis of BPA.

2.4. Quality assurance/quality control

In order to ensure reliable results in the analysis, a strict QA/QC protocol was established and followed. In all sample preparation procedures (including sample collection), plastic material and detergents were discarded to avoid contamination and blank problems. Furthermore, glassware was carefully washed with acetone, Milli-Q water and methanol prior to use (Salgueiro-González et al., 2012a).

A 7-point calibration curve (MQL-1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ for waters, MQL-2000 ng g^{-1} dw for sediment and MQL-5000 ng g^{-1} dw for biota), three recovery samples of each matrix (i.e. the spiked samples enriched with the target compounds standard mixture and processed as explained previously), seven blank samples for each matrix, and the samples of water, sediment and biota collected in the Minho River were analyzed. The relative recoveries of the analyzed compounds during the applied methods were calculated by subtracting (average) blank concentrations from the arithmetic mean of the concentrations measured in three spiked samples of each matrix. For water samples, relative recoveries varied from 84% to 103% (RSD < 10%). For sediment and biota samples, the recoveries varied from 94% to 100% (RSD < 6%) and from 80% to 107% (RSD < 17%), respectively. All procedural blanks were ten times below the method quantitation limits (MQL) which were set as $X_b + 10\text{SD}_b$ (X_b average and SD_b standard deviation of the seven blank samples from pristine areas). The MQL values are shown in Table 1. Moreover, the MQL for nonylphenols (4-*n*-NP and NP) in water was lower than the 30% of the EQS as suggested by Directive 2009/90/EC (COM, 2009).

3. Results and discussion

3.1. APs and BPA in water samples: spatial distribution, seasonal variations and sources of contamination

Table 2 summarizes the concentration levels of APs and BPA detected in water samples during two sampling campaigns (May and November of 2012). In the first sampling campaign (May), a marked difference in concentrations of linear and branched isomers of APs could be noticed. Linear isomers (4-*n*-OP and 4-*n*-NP) were found only in one sample (TM02-lt) at very low concentrations ($<0.012 \mu\text{g L}^{-1}$) whereas branched isomers 4-tOP and NP were determined in all sampling points at concentrations ranging from 0.018 to $0.088 \mu\text{g L}^{-1}$ and between 0.033 and $1.03 \mu\text{g L}^{-1}$, respectively. Lower concentration levels were observed at high tide which may be due to a dilution effect. The measured concentrations were lower than the EQS established in Directive 2013/39/EU (Directive, 2013), which are shown in Table 1. BPA was measured at three sampling points, at concentrations higher than $3.7 \mu\text{g L}^{-1}$ in two of them (BPA hot spots), which could indicate point sources of contamination. In these points, the PNEC established for BPA in freshwater ($1.6 \mu\text{g L}^{-1}$) was exceeded and therefore, more research is needed to understand the adverse effects associated with the detected concentration levels and to identify additional measures to control the possible discharges in these points.

In comparison with the spring campaign, decreased concentrations for all compounds were measured during the autumn season (November). The presence of 4-tOP, 4-*n*-OP, 4-*n*-NP and BPA was not detected whereas NP was measured only at four sampling points (TM02-ht, TM04-ht, TM05-ht and TM07) at levels ranging from 0.04 to $0.089 \mu\text{g L}^{-1}$. At these four points, NP concentrations were slightly higher than those obtained in spring season. Again, the measured concentrations were lower than the established EQS.

In comparison with other concentration levels reported in the literature (Table S3, Supplementary material), the concentrations for branched APs in Minho River were similar to those measured in Douro River (Portugal) (Rocha et al., 2012) and 22 rivers in China (Wang et al., 2013). Higher concentrations than those reported in this study were found in other Spanish rivers located in industrial areas such as Ter (Cespedes et al., 2006) and Ibaizabal (Iparraguirre et al., 2012). Rocha et al. (2014) reported higher concentration of these compounds in Mondego River (Portugal) which was explained by the proximity of water treatment plant discharges (WWTP). The concentrations of BPA measured at the BPA hot spots were higher than the ones reported elsewhere (Pojana et al., 2007; Rocha et al., 2014; Zhang et al., 2014).

Total EDC concentration was calculated as a sum of the measured concentrations of individual target compounds. For the samples in

Table 1

Method quantitation limits (MQL) of the analytical methodologies used for water, sediment and biota samples determination.

Compound	Water analysis			Sediment analysis	Biota analysis
	DLLME-LC-MS/MS ^a		Directive, 2013/39/EU values	SPLE-LC-MS/MS ^b	SPLE-LC-MS/MS ^c
	MQL (µg L ⁻¹)			MQL (ng g ⁻¹ dw)	MQL (ng g ⁻¹ dw)
4-tOP	0.008	0.1	Not applicable	2.9	2.6
4-n-OP	0.006	0.1	Not applicable	0.3	1.7
4-n-NP	0.005	0.3	2	0.2	2.3
NP	0.030	0.3	2	4.0	4.7
BPA	0.020	–	–	2.9	3.3

AA, annual average; DLLME, dispersive liquid–liquid microextraction; LC-MS/MS, liquid chromatography tandem mass spectrometry; MAC, maximum allowable concentration; MQL, method quantitation limit; SPLE, selective pressurized liquid extraction.

^a Salgueiro-González et al. (2012b).

^b Salgueiro-González et al. (2014).

^c Salgueiro-González et al. (2012c).

which the concentration of a compound was lower than MQL, the half of the MQL was considered, according to the Directive 2009/90/EC (COM, 2009). In the spring season, total EDC concentration levels varied from 0.080 to 5.9 $\mu\text{g L}^{-1}$ (average 0.888 $\mu\text{g L}^{-1}$) with BPA being the major contributor (78% of total EDCs concentration). During the autumn campaign, the total EDC concentrations in water ranged between 0.007 and 0.021 $\mu\text{g L}^{-1}$ (average 0.010 $\mu\text{g L}^{-1}$), with NP accounting for around 60% of the total EDC concentrations. The difference in contaminant profile during these two seasons could be explained by hydrodynamic factors, biodegradation by microorganisms and/or photolysis reactions (Wang et al., 2013; Wright-Walters et al., 2011).

The study showed very uniform distribution of 4-tOP and NP along the river basin and its tributaries during the spring season campaign. Background values ($\sim 0.05 \mu\text{g L}^{-1}$ for branched isomers) may be attributed to the absence of connection of households to the WWTP: more than 10% of municipal wastewater enters directly in estuarine waters (<http://insaar.apambiente.pt>). Also widespread agricultural activities may be a non-point source of contamination of the river basin by the target compounds (15–30% of the studied area are cultivated lands (Vale et al., 2014)). Higher concentration of NP was measured at TM02-lt. At this point, more intensive nautical (ferry and recreational boats) and fishing activities are present and thus the use of detergents and other products used for the cleaning of boats may result in higher NP concentrations. The presence of linear isomers (4-n-OP and 4-n-NP) could be explained by the discharges of WWTP effluents in these areas (e.g. WWTP of Tomiño, 13,000 inhabitants) as these linear compounds may be generated by degradation of alkylphenol ethoxylates in WWTPs. BPA was found at very high concentrations in TM02-lt and TM03-lt which may be due to the impact of local industrial activities including epoxy-based coating and polyurethane manufacturing and canning activities.

3.2. Levels and spatial distribution of APs and BPA in sediments

Fig. 2 shows the total EDC concentration levels measured in sediment samples. As explained before, sediment samples were collected only during the May campaign. These concentrations varied between 13 and 4536 ng g^{-1} dw (average of 1041 ng g^{-1} dw), with a major contribution of NP (i.e. 95% to the total EDC concentration) which demonstrated the high capability of this compound to be accumulated in sediments.

The sediment composition, in terms of individual EDC content, was similar to the one observed for waters. Linear isomers were found in only one sample (TM12) at very low concentrations ($<2.5 \text{ ng g}^{-1}$ dw). On the other hand, branched isomers 4-tOP and NP were determined in 95% of samples at concentrations ranging between 9.3 and 74.5 ng g^{-1} dw and in 86% of samples at levels ranging from 21 to 4460 ng g^{-1} dw, respectively. The highest concentrations of these compounds were measured in sample taken at TM02. As noted before, at this sampling point, the water samples showed the highest concentration of EDCs, as well, which could be associated with the nautical, fishing and agricultural activities near this point. Bisphenol A was quantified in 23% of analyzed sediment samples at concentrations ranging from 4.3 to 130 ng g^{-1} dw. At some sampling points (TM02 and TM03), BPA was not detected in sediment samples but it was present high concentrations in water samples ($>3.7 \mu\text{g L}^{-1}$). This may indicate a point-source and recent contamination that did not leave enough time for BPA to adsorb to sediment.

The EDC concentrations found in sediment in this study are two orders of magnitude higher than those reported by Brix et al. (2010) for the Llobregat River (NE Spain) sampling in 2005–2006 (Table S4, Supplementary Material). Similar EDC concentrations to those found in the Minho River sediment samples were reported for other rivers

Table 2Environmental levels ($\mu\text{g L}^{-1}$) of APs and BPA in water samples in the two sampling campaigns: May and November, 2012. Positive samples were represented in bold.

Sampling point ^a	4-tOP		4-n-OP		4-n-NP		NP		BPA	
	May	November	May	November	May	November	May	November	May	November
TM01-ht	0.041	<0.008	<0.006	<0.006	<0.005	<0.005	0.088	<0.030	0.46	<0.020
TM01-lt	0.064	<0.008	<0.006	<0.006	<0.005	<0.005	0.061	<0.030	<0.020	<0.020
TM02-ht	0.037	<0.008	<0.006	<0.006	<0.005	<0.005	0.044	0.069	<0.020	<0.020
TM02-lt	0.077	<0.008	0.012	<0.006	0.006	<0.005	1.03	<0.030	4.8	<0.020
TM03-ht	0.071	<0.008	<0.006	<0.006	<0.005	<0.005	0.078	<0.030	<0.020	<0.020
TM03-lt	0.036	<0.008	<0.006	<0.006	<0.005	<0.005	0.065	<0.030	3.7	<0.020
TM04-ht	0.088	<0.008	<0.006	<0.006	<0.005	<0.005	0.057	0.089	<0.020	<0.020
TM04-lt	0.036	<0.008	<0.006	<0.006	<0.005	<0.005	0.055	<0.030	<0.020	<0.020
TM05-ht	0.065	<0.008	<0.006	<0.006	<0.005	<0.005	0.056	0.04	<0.020	<0.020
TM05-lt	0.018	<0.008	<0.006	<0.006	<0.005	<0.005	0.04	<0.030	<0.020	<0.020
TM06	0.068	<0.008	<0.006	<0.006	<0.005	<0.005	0.077	<0.030	<0.020	<0.020
TM07	0.048	<0.008	<0.006	<0.006	<0.005	<0.005	0.033	0.058	<0.020	<0.020
TM08	0.027	<0.008	<0.006	<0.006	<0.005	<0.005	0.038	<0.030	<0.020	<0.020

^a High tide (ht) and low tide (lt).

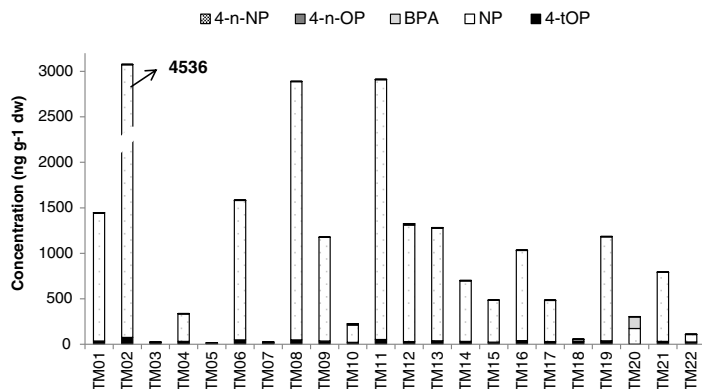


Fig. 2. Total EDC concentration ($\text{ng g}^{-1} \text{ dw}$) found in sediment samples. Contribution of each compound to the total concentration.

located in Iberian Peninsula such as Ebro, Guadalquivir, Llobregat and Júcar (2010–2011) (Gorga et al., 2015), in Italy (Pojana et al., 2007) and Canada (Mayer et al., 2007), while Mortazavi et al. (2012) reported higher concentration levels in Anzali Wetland in Iran (Mortazavi et al., 2012).

3.3. Seasonal and spatial distribution of APs and BPA in biota

Concentrations of APs and BPA measured in *C. fluminea* samples are shown in Fig. 3. As shown, in spring sampling campaign linear isomers

were not detected in *C. fluminea* samples, but the branched isomers, also characterized by higher sorption affinity, were measured in almost all samples. As regards the occurrence of individual compounds in biota samples, 4-tOP was uniformly distributed in all samples at concentrations between 19.9 and 39.7 $\text{ng g}^{-1} \text{ dw}$ and NP was found at levels ranging from 306 to 1756 $\text{ng g}^{-1} \text{ dw}$. More than 80% of NP positive samples exceeded 1000 $\text{ng g}^{-1} \text{ dw}$ which indicated important bioaccumulation of NP in biota samples. BPA was determined in only two samples taken at TM8 and TM15, at concentrations of 31 and 412 $\text{ng g}^{-1} \text{ dw}$, respectively.

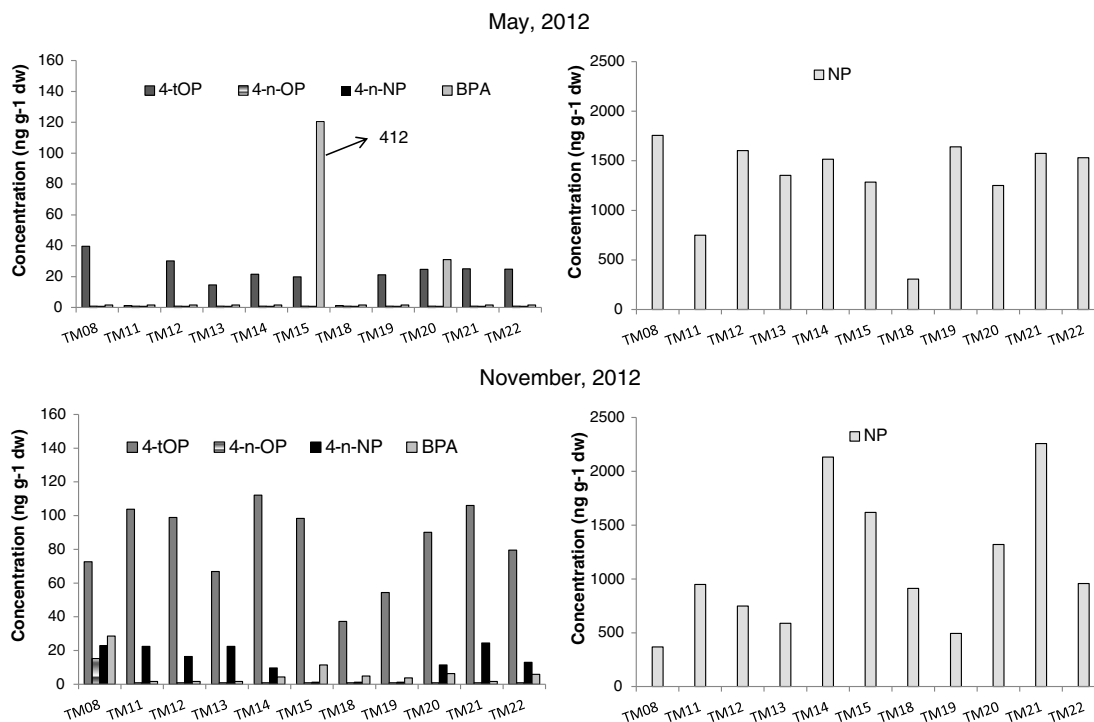


Fig. 3. Levels of APs and BPA ($\text{ng g}^{-1} \text{ dw}$) measured in *Corbicula fluminea* samples during the two campaigns: May and November of 2012.

More positive samples for all the compounds were found during the second sampling campaign (autumn). Branched isomers were detected in 100% of the samples at levels ranging from 37 to 112 ng g⁻¹ dw (4-tOP) and 368 to 2258 ng g⁻¹ dw (NP). On the other hand, BPA were measured in 63% of the samples at concentrations between 3.7 and 28.6 ng g⁻¹ dw.

The presence of 4-*n*-OP was determined in one sample (TM8) at concentration of 15.2 ng g⁻¹ dw whereas 4-*n*-NP was found in 70% of samples at levels between 9 and 24.5 ng g⁻¹ dw. The fact that 4-*n*-NP was found in majority of biota samples indicated potential bioaccumulation ability, making it a candidate for a more detailed environmental risk assessment.

The total EDC concentration calculated for the two campaigns varied between 310 and 1799 ng g⁻¹ dw (average of 1388 ng g⁻¹, median of 1560 ng g⁻¹ dw) in May and from 507 to 2259 ng g⁻¹ dw (average of 1228 ng g⁻¹ dw, median of 1057 ng g⁻¹ dw) in November. In both cases the major contributor to the total EDC concentration was NP (more than 95%). Difference in EDC concentrations between seasons can be attributed to the life stage of this species (Sousa et al., 2008b).

No researches about the presence of APs and BPA in *C. fluminea* have been found in the literature. Ferrara et al. (2001) studied the presence of branched isomers in different species in Adriatic Sea (Italy) such as clams, mussels, cuttlefish and squid (Table S5, Supplementary material). The reported values are lower than found in this work for Minho River Estuary, but the comparison is not straightforward as the characteristics of water bodies and the species are different for these two studies (i.e. bioaccumulation factor of the species and the salinity of waters). Therefore, more studies about the bioaccumulation of EDCs in biota are needed.

3.4. Estimation of the partitioning and bioaccumulation of the target compounds

The distribution coefficient (K_d), often used to assess the ability of chemical substances to be adsorbed by the solid phase (sediments) from the liquid phase (waters) (Zhou et al., 2013), was evaluated for branched isomers (4-tOP and NP) because these isomers were the main contributors to the total EDC concentration in sediment. The K_d was calculated according to the following equation:

$$K_d = (C_{sed}/C_{water})$$

where C_{sed} and C_{water} are concentrations of a compound in sediments and water respectively. The obtained experimental values of log K_d were 2.1 and 3.3 (mean: 2.73) for 4-tOP, and 3.6 and 5.0 (mean 4.3) for NP, showing their strong affinity for sediments. Different AP sorption could be explained by the polarity of compounds: the K_d values decreased with increasing polarity (Brix et al., 2010). Furthermore, NP is an isomeric compound and each isomer could be adapted to the multiple types of sorption sites, increasing the sorption process (Navarro-Ortega et al., 2010). These parameters were slightly lower (same order of magnitude) than those reported in previous studies (Brix et al., 2010; Pojana et al., 2007; Ying et al., 2002).

Bioaccumulation factor (BAF) and biota-sediment accumulation factor (BSAF or log BSAF) are commonly used metrics in risk assessment to predict bioaccumulation of chemical contaminants in aquatic organisms. According to the United States Environmental Protection Agency (US-EPA) ((US-EPA, 2000), BAF is defined as the ratio (in liters per kilogram of tissue) of the concentration of a chemical in the tissue of an aquatic organism to its concentration in water, in situations where both the organism and its food are exposed. BSAF is the ratio (in kilograms of sediment per kilogram of tissue) of the concentration of a chemical in tissue of an aquatic organism to its concentration in surface sediment; both the organism and its food are exposed, and surface sediment is representative of average surface sediment in the vicinity of the organism.

In our study, these parameters were estimated according to the following equations:

$$BAF = C_{C. fluminea}/C_{water} \quad (1)$$

$$BSAF = C_{C. fluminea}/C_{sediment} \quad (2)$$

where $C_{C. fluminea}$ is the concentration of a compound measured in each biota sample; C_{water} is the average concentration measured of a compound in water samples taken close to the sampling point of the biota sample; and $C_{sediment}$ is the concentration of a compound measured in surface sediment collected at the biota sampling site (see Fig. 1).

BAF field-estimated values were predicted for all compounds which were present in at least three sampling points (water and biota) in each campaign (Klosterhaus et al., 2013). The obtained BAFs (expressed in L kg⁻¹) were 439 ± 161 for 4-tOP, 2788 ± 83.8 for NP in May and 3649 ± 131.5 for NP in November campaign, respectively. Chemicals with BAF values >1000, 2000 or 5000 L kg⁻¹ are considered bioaccumulative by various regulatory authorities (Klosterhaus et al., 2013), and thus 4-tOP is not an important bioaccumulative compound in this species whereas NP is bioaccumulative. Differences between seasons could be explained by environmental parameters (temperature, pH, total organic carbon, etc.) as well as by organisms' characteristics (lipid content, health status, and gender or life stage) which could affect the metabolism of the compounds (Arnot and Gobas, 2006). Differences between BAFs of different compounds are related to their hydrophobic and metabolic characteristics. The hydrophobic properties of 4-tOP and NP are similar, therefore the difference in bioaccumulation may be ruled by metabolism. However, we did not find enough data on the metabolic routes of these compounds in clams to prove the claim. No previous works related to the analysis of the target compounds in *C. fluminea* could be found in literature. For this reason, BAFs estimated for these analytes in other species were reviewed in Table S6a (Supplementary material).

Biota-sediment accumulation factors, as log BSAF, were estimated for branched isomers for the May campaign (again, BPA and linear isomers were not measured in more than three sampling points). The obtained field values were 1.56 ± 0.43 for 4-tOP and 2.6 ± 0.97 for NP. These BSAF values were similar (same order of magnitude) to some literature values estimated for these compounds in biota (Table S6b, Supplementary material).

3.5. Implications

3.5.1. Environmental risk assessment: risk quotient estimation

The aquatic risk assessment for the measured EDCs was evaluated on the basis of risk quotient (RQ) estimation, which is defined as the ratio of maximum measured environmental concentration (MEC) to the predicted no-effect concentration (PNEC) to evaluate ecological risk (EU, 1994). Low risk to the environment is considered when RQ is below 0.1; moderate risk for RQ between 0.1 and 1, and high risk when this value is greater than 1 (Blair et al., 2013).

PNEC values are normally computed by dividing the lowest toxicity value observed for the most sensitive species (lowest short term L(E)C50 or long-term NOEC value) available in the literature by an assessment factor based on eco-toxicity data (1000 or 10, respectively), which can vary according to experimental situations (Silva et al., 2014).

For RQ estimation in this study, MEC measured in water samples were considered. Furthermore, the lowest PNEC values for surface waters found in different reports of European Commission were used (PNEC_{BPA}, *Pimephales promelas*: 1.6 µg L⁻¹ (EU, 2002); PNEC_{4-OP}, *Oncorhynchus mykiss*: 0.122 µg L⁻¹ (EC, 2005b); PNEC_{4-NP}, *Scenedesmus subspicatus*: 0.33 µg L⁻¹ (EC, 2005a)). The mean and maximum detected concentrations were the MECs for the general (RQ_m) and for the worst case (RQ_{ex}) scenarios, respectively (Palma et al., 2014). Mean concentration value for a compound was calculated as the arithmetic mean of all the

positive samples for both sampling campaign (May and November). In the case of samples in which concentration of a compound was lower than MQL, the half of its MQL was considered, according to the Directive 2009/90/EC (COM, 2009).

As shown in Fig. 4a, low and moderate risk ($RQ_m < 1$) were observed for all compounds along the Minho River and its tributaries during two campaigns. Considering the maximum concentrations, high risk was observed for BPA and NP ($RQ_{ex} > 1$), as shown in Fig. 4b. In the case of NP, the high RQ_{ex} is attributed to its high toxicity, whereas in the case of BPA, it is related to its high concentration measured at some sampling points along Minho River.

The aquatic risk caused by EDCs may lead to changes in communities, decreasing the most sensitive species and increasing the most resistant ones, with a consequent loss of biodiversity (Palma et al., 2014). Although the measured values complied with the EQS, potential risk associated with these EDCs should not be neglected, particularly in the case of BPA and NP.

3.5.2. Human health impact. Daily exposure estimations

To assess the risk of an EDC to human health, different parameters can be considered: the type and concentration of compounds; the duration, frequency and route of exposure; its metabolism, its distribution and elimination from body and the vulnerability of the consumer (Plotan et al., 2014). Moreover, humans are not exposed to only one compound in their daily life. Given the fact that pollutants can have additive or antagonistic/synergistic, or other interactive effects by operating at different points in cell signaling system (Salgueiro-González et al., 2013), mixtures of pollutants should be considered when assessing the risk from the presence/intake of these compounds to the human health (Buchinger et al., 2013; Parrella et al., 2013; Wetzel et al., 2013).

Diet is one of the most important routes of EDC exposure (Geens et al., 2015). Taking into account that, as a worst case scenario, water and biota of Minho River could be consumed by the population of this area, the possible risk for the inhabitants should be evaluated. For all

the reasons commented before, and as a first evaluation, estrogenic activity of samples and the impact in humans via water and biota ingestion were estimated.

Estrogenic activity is normally estimated in terms of estradiol equivalent quantity (EEQ) by employing the following equations:

$$EEQ_i = C_i \times EEF_i \text{ and } EEQ_t = \sum EEQ_i$$

where i refers to the compound i with concentration C , EEQ_t is the total estradiol equivalent quantity and EEF_i is the estradiol equivalency factor. The EEFs were defined as the EC_{50} of each compound relative to the EC_{50} of 17- β -estradiol, where EC_{50} is the contaminant concentration that produces a 50% maximal response estrogenic (Brix et al., 2010). In this study, literature EEF values of target EDCs were used (Table 3) that were determined in ER-CALUX in vitro test (de Voogt and van Hattum, 2003; X. Zhang et al., 2011). The EEQ_i and EEQ_t equations were applied to the both campaigns and the total EEQ were compared. For calculations, the estrogenic potential of each sample within the same sampling campaign were averaged. Table 3 shows the contribution of each compound to the total estrogenic activity in each campaign (water and biota samples).

Differences in EEQ_t values between water campaigns were observed. Higher EEQ_t (0.11 ng L^{-1}) were found in May, which were more than four orders of magnitude higher than those calculated for the November campaign. The main contributor to the estrogenic potential of waters was NP, which accounted for more than 70% of the total EEQs in the two samplings. Although BPA was present at only few sampling points, it is the second most relevant compound in terms of estrogenic activity. The contribution of 4-tOP and the linear isomers was minimal (<1%). Regarding the biota samples, similar EEQ_t values were obtained in the two campaigns. Again, NP was the main contributor to the total estrogenic activity with more than 95% in both cases.

Since higher estrogenic activity in waters was determined in May, the effect of the human exposure to these EDCs via water ingestion will be considered for this campaign as the worst case scenario. Daily water intakes estimated by US-EPA (EPA, 1997) for children (0.18 L d^{-1}) and adults (1.4 L d^{-1}) were considered. The levels of exposure via water ingestion in terms of EEQ were estimated to be 0.019 ng d^{-1} for children and 0.15 ng d^{-1} for adults.

The estrogenic activity determined for the May campaign was considered also for the estimation of EDCs exposure via biota ingestion. Daily consumption of molluscs of Spanish children (17.6 g d^{-1}) and adults (43.3 g d^{-1}) from the European Food Safety Authority (EFSA) (EFSA, 2011) database was considered. The levels of exposure via biota ingestion for children and adults in terms of EEQ were estimated to be 4.28 and 10.50 ng d^{-1} , respectively.

Finally, the obtained results were added up and compared with the acceptable daily intake (ADI) of estradiol (E2) to evaluate the possible damage to human health. This value was established in reference to the no-observed-adverse-effect-level concentration $<3.5 \mu\text{g d}^{-1}$ set by the Food and Agricultural Organisation (assuming an adult median weight of 70 kg). The obtained results were four orders of magnitude lower than the established ADI value. Hence, the presence of these EDCs in the Minho River is not expected to have negative effects on the health of its inhabitants in terms of estrogenic effects via ingestion. Nevertheless, other exposure routes such as air inhalation, diet or skin contact, should be taken into account before making any firm conclusion on the issue (Salgueiro-González et al., 2013).

4. Conclusions

The present study assessed the occurrence, distribution and bioaccumulation of APs and BPA in water, sediment and *C. fluminea* from the European Minho River estuary. The occurrence of the EDCs in the three compartments has been associated with WWTP, industrial

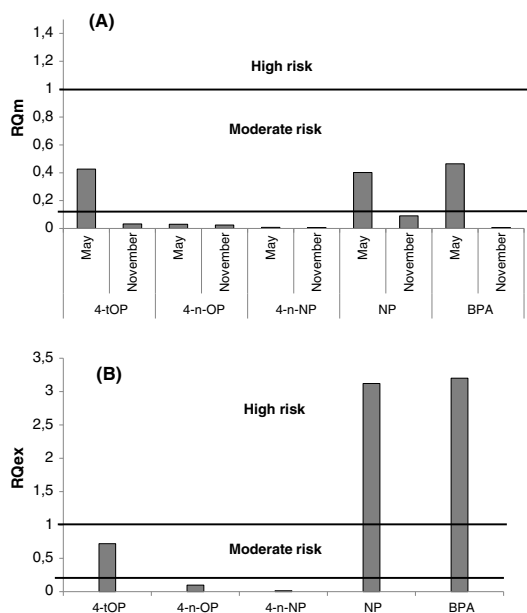


Fig. 4. Risk quotient of the Minho River estimated taking into account: (a) the concentration mean of each compound (RQ_m) in each sampling campaign and (b) the maximum level of concentration of each EDC (RQ_{ex}).

Table 3
Estrogenic activity of waters (ng L⁻¹) and biota (ng g⁻¹ dw) samples measured in the Minho River.

Compound	EEF	Water samples				Biota samples			
		May		November		May		November	
		EEQ _i	%	EEQ _i	%	EEQ _i	%	EEQ _i	%
4-tOP	1.9E–005 ^a	–	–	–	–	–	–	1.6E–003	0.2
4-n-OP	4.5E–006 ^a	–	–	–	–	–	–	–	–
4-n-NP	1.8E–007 ^a	–	–	–	–	–	–	–	–
NP	9E–004 ^b	1.2E–001	77.7	5.4E–009	81.7	1.19E–000	97.9	1.01E–000	99.6
BPA	6E–004 ^b	4.2E–001	22.3	9.0E–006	18.3	2.4E–002	2.1	3.9E–003	0.35
EEQ _t		0.11		0.000009		1.22		1.01	

Estradiol equivalency factor (EEF); estradiol equivalent quantity (EEQ) and contribution of each compound to the estrogenic activity of the sample (in percent).

^a de Voogt and van Hattum (2003).

^b X. Zhang et al. (2011).

discharges and nautical, fishing and agricultural activities as the main sources of contamination with these compounds.

The analysis of water samples showed generally low concentrations of target compounds (<0.1 µg L⁻¹). The EQS established in the Directive 2013/39/EU for OPs (0.1 µg L⁻¹) and NP (2 µg L⁻¹) in water were not surpassed in any case. A decrease in water total EDC concentrations was observed from spring to autumn, i.e. from 0.178 µg L⁻¹ in May to 0.011 µg L⁻¹ in November; however similar values were shown in *C. fluminea* samples (1388 and 1228 ng g⁻¹ dw in spring and autumn, respectively). Total concentration of EDCs measured in sediments collected in May varied between 13 and 4536 ng g⁻¹ dw (average of 1041 ng g⁻¹ dw).

Linear isomers were scarcely detected in the ecosystem whereas branched isomers were measured in almost all samples. A uniform distribution of 4-tOP in the three compartments (water, sediment and biota) was found, while NP was measured at higher concentrations in sediment and biota proving its adsorption and bioaccumulation capability. Highest levels of BPA (>3.7 µg L⁻¹) were found in some waters samples, but its presence in sediment and biota is limited.

Bioaccumulation factors and sediment–water partition coefficients were estimated for branched isomers, and high affinity for sediments and biota was observed only for NP. Environmental risk assessment using risk quotients indicated low and moderate risk for the aquatic environment from the presence of the target compounds at all sampling points. However, higher risk was estimated for the points where BPA and NP were detected at maximum concentrations. For this reason, further extensive studies are required to make the decision on controlling the studied sites. The estimation of daily intake of the target EDCs via water and biota ingestion from the Minho River showed no risk for human health.

Acknowledgments

This work has been financially supported by Xunta de Galicia and co-funded by ERDF (Ref GRC2013-047), by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness co-funded by ERDF (CTM2013-48194-C3-2-R) and by Team Miño Project: “*Transferencia de herramientas para la Evaluación, Ordenación, Gestión y Educación Ambiental en Estuarios*”, which is funded by European Union, ERDF and POCTEP 2007–2013 (0543_TEAM_MINO_1_E). The authors would like to thank the staff of the Chemical Pollution Laboratory of the Centro Oceanográfico de Vigo (IEO) and ECIMAT (Universidade de Vigo) for their assistance during sampling and sample preparation, and A. Freire for making the sampling map. N. Salgueiro acknowledges Xunta de Galicia and Campus do Mar, International Campus of Excellence, for the Ph.D grant (Plan I2C, 2012).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.05.048>.

References

- (US-EPA) USEPA, 2000. Methodology for Deriving Ambient Water Quality Criteria for the Protection of Human Health.
- Ahn, Y.G., Shin, J.H., Kim, H.Y., Khim, J., Lee, M.K., Hong, J., 2007. Application of solid-phase extraction coupled with freezing–lipid filtration clean-up for the determination of endocrine-disrupting phenols in fish. *Anal. Chim. Acta* 603, 67–75.
- Arnot, J.A., Gobas, F.A.P.C., 2006. A review of bioconcentration factor (BCF) and bioaccumulation factor (BAF) assessments for organic chemicals in aquatic organisms. *Environ. Rev.* 14, 257–297.
- Blair, B.D., Crago, J.P., Hedman, C.J., Klaper, R.D., 2013. Pharmaceuticals and personal care products found in the Great Lakes above concentrations of environmental concern. *Chemosphere* 93, 2116–2123.
- Brix, R., Postigo, C., Gonzalez, S., Villagrasa, M., Navarro, A., Kuster, M., et al., 2010. Analysis and occurrence of alkylphenolic compounds and estrogens in a European river basin and an evaluation of their importance as priority pollutants. *Anal. Bioanal. Chem.* 396, 1301–1309.
- Buchinger, S., Heininger, P., Schluesener, M., Reifferscheid, G., Claus, E., 2013. Estrogenic effects along the river Saale. *Environ. Toxicol. Chem.* 32, 526–534.
- Cespedes, R., Lacorte, S., Ginebreda, A., Barcelo, D., 2006. Chemical monitoring and occurrence of alkylphenols, alkylphenol ethoxylates, alcohol ethoxylates, phthalates and benzothiazoles in sewage treatment plants and receiving waters along the Ter River basin (Catalonia, N. E. Spain). *Anal. Bioanal. Chem.* 385, 992–1000.
- Cladiere, M., Gasperi, J., Lorgeoux, C., Bonhomme, C., Rocher, V., Tassin, B., 2013. Alkylphenolic compounds and bisphenol A contamination within a heavily urbanized area: case study of Paris. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 2973–2983.
- COM, 2009. Commission Directive 2009/90/EC of 31 July 2009 Laying Down, Pursuant to Directive 200/60/EC of the European Parliament and of the Council, Technical Specifications for Chemical Analysis and Monitoring of Water Status.
- COM, 2010. Common Implementation Strategy for the Water Framework Directive (2000/60/EC). Guidance No. 25 on Chemical Monitoring of Sediment and Biota Under the Water Framework Directive.
- COM, 2011. Technical Guidance For Deriving Environmental Quality Standards.
- de Voogt, P., van Hattum, B., 2003. Critical factors in exposure modeling of endocrine active substances. *Pure Appl. Chem.* 75, 1933–1948.
- Directive, 2000. Directive 2000/60/EC of the Parliament and of the Council of 23 October 2000 Establishing a Framework for Community Action in the Field of Water Policy.
- Directive, 2008. Directive 2008/105/EC of Parliament and of the Council of 16 December 2008 on Environmental Quality Standards in the Field of Water Policy, Amending and Subsequently Repealing Council Directives 82/176/EEC, 83/513/EEC, 84/156/EEC, 84/491/EEC, 86/280/EEC and Amending Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council.
- Directive, 2011. Commission Directive 2011/2/EU of January 2011 Amending Directive 2002/72/EC as Regards the Restriction of Use Bisphenol A in Plastic Infant Feeding Bottles.
- Directive, 2013. Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council of 12 August 2013 Amending Directives 2000/60/EC as Regards Priority Substances in the Field of Water Policy.
- EC, 2005a. Common Implementation Strategy for the Water Framework Directive. Environmental Quality Standards (EQS). Substance Data sheet (24): Nonylphenols and 4-Nonylphenols.
- EC, 2005b. Common Implementation Strategy for the Water Framework Directive. Environmental Quality Standards (EQS). Substance Data sheet (25): Octylphenols (Paratert-octylphenols).
- EFSA, 2011. Comprehensive Food Consumption Database. European Food Safety Authority.
- EPA, 1997. EPA. Exposure Factors Handbook.
- EU, 1994. EU Ad Hoc Working Party, III/5504/94. Draft 4. Assessment of Potential Risks to the Environment Posed by Medicinal Products for Human Use, Excluding Products Containing Live Genetically Modified Organisms.
- EU, 2002. Updated European Union Risk Assessment Report 4,4'-Isopropylidenediphenol (Bisphenol A) (EUR 24588EN).
- Fabregat-Cabello, N., Castillo, A., Sancho, J.V., Gonzalez, F.V., Francesc Roig-Navarro, A., 2013. Fast methodology for the reliable determination of nonylphenol in water samples by minimal labeling isotope dilution mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1301, 19–26.

- Ferrara, F., Fabietti, F., Delise, M., Bocca, A.P., Funari, E., 2001. Alkylphenolic compounds in edible molluscs of the Adriatic Sea (Italy). *Environ. Sci. Technol.* 35, 3109–3112.
- Geens, T., Dierckx, A.C., Dirinck, E., Malarvannan, G., Van Gaal, L., Jorens, P.G., et al., 2015. Daily intake of bisphenol A and triclosan and their association with anthropometric data, thyroid hormones and weight loss in overweight and obese individuals. *Environ. Int.* 76, 98–105.
- Gorga, M., Insa, S., Petrovic, M., Barcelo, D., 2015. Occurrence and spatial distribution of EDCs and related compounds in waters and sediments of Iberian rivers. *Science Of The Total Environment* 503, 69–86.
- <http://insaapambiente.pt>, t. Inventário Nacional de Sistemas de Abastecimento de Água e de Águas Residuais <http://insaapambiente.pt>.
- <http://snirh.apambiente.pt/>, /. Sistema Nacional de Informação de Recursos Hídricos <http://snirh.apambiente.pt/>.
- <http://www.chminosil.es/es/>, /. Confederación Hidrográfica Miño Sil <http://www.chminosil.es/>.
- <http://www.team-minho.eu>, u. Team Minho Project. Transferencia de herramientas para la Evaluación, Ordenación, Gestión y Educación Ambiental en Estuarios <http://www.team-minho.eu>.
- Ilari, M.I., Souza, A.T., Antunes, C., Guilhermino, L., Sousa, R., 2014. Influence of the invasive Asian clam *Corbicula fluminea* (Bivalvia: Corbiculidae) on estuarine epibenthic assemblages. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 143, 12–19.
- Iparaguirre, A., Navarro, P., Prieto, A., Rodil, R., Olivares, M., Fernandez, L.-A., et al., 2012. Membrane-assisted solvent extraction coupled to large volume injection-gas chromatography–mass spectrometry for the determination of a variety of endocrine disrupting compounds in environmental water samples. *Anal. Bioanal. Chem.* 402, 2897–2907.
- Jakimska, A., Huerta, B., Barganska, Z., Kot-Wasik, A., Rodriguez-Mozas, S., Barcelo, D., 2013. Development of a liquid chromatography–tandem mass spectrometry procedure for determination of endocrine disrupting compounds in fish from Mediterranean rivers. *J. Chromatogr. A* 1306, 44–58.
- Klosterhaus, S.L., Grace, R., Hamilton, M.C., Yee, D., 2013. Method validation and reconnaissance of pharmaceuticals, personal care products, and alkylphenols in surface waters, sediments, and mussels in an urban estuary. *Environ. Int.* 54, 92–99.
- Mayer, T., Bennie, D., Rosa, F., Rekas, G., Palabrica, V., Schachtschneider, J., 2007. Occurrence of alkylphenolic substances in a Great Lakes coastal marsh, Cootes Paradise, ON, Canada. *Environ. Pollut.* 147, 683–690.
- Mil-Homens, M., Costa, A.M., Fonseca, S., Trancoso, M.A., Lopes, C., Serrano, R., et al., 2013. Characterization of heavy-metal contamination in surface sediments of the Minho River estuary by way of factor analysis. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 64, 617–631.
- Mohapatra, D.P., Brar, S.K., Tyagi, R.D., Surampalli, R.Y., 2010. Physico-chemical pretreatment and biotransformation of wastewater and wastewater sludge – fate of bisphenol A. *Chemosphere* 78, 923–941.
- Mortazavi, S., Bakhtiari, A.R., Sari, A.E., Bahramifar, N., Rahbarizade, F., 2012. Phenolic endocrine disrupting chemicals (EDCs) in Anzali Wetland, Iran: elevated concentrations of 4-nonylphenol, octylphenol and bisphenol A. *Marine Poll Bull.* 64, 1067–1073.
- Navarro-Ortega, A., Tauler, R., Lacorte, S., Barcelo, D., 2010. Occurrence and transport of PAHs, pesticides and alkylphenols in sediment samples along the Ebro River Basin. *J. Hydrol.* 383, 5–17.
- Palma, P., Kock-Schulmeyer, M., Alvarenga, P., Ledo, L., Barbosa, I.R., Lopez de Alda, M., et al., 2014. Risk assessment of pesticides detected in surface water of the Alqueva reservoir (Guadiana basin, southern of Portugal). *Sci. Total Environ.* 488–489, 208–219.
- Parrella, A., Lavorgna, M., Criscuolo, E., Isidori, M., 2013. Mutagenicity, genotoxicity, and estrogenic activity of river porewaters. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 65, 407–420.
- Plotan, M., Elliott, C.T., Frizzell, C., Connolly, L., 2014. Estrogenic endocrine disruptors present in sports supplements. A risk assessment for human health. *Food Chem.* 159, 157–165.
- Pojana, G., Gomiero, A., Jonkers, N., Marcomini, A., 2007. Natural and synthetic endocrine disrupting compounds (EDCs) in water, sediment and biota of a coastal lagoon. *Environ. Int.* 33, 929.
- Rocha, M.J., Cruzeiro, C., Ferreira, C., Rocha, E., 2012. Occurrence of endocrine disruptor compounds in the estuary of the Iberian Douro River and nearby Porto Coast (NW Portugal). *Toxicol. Environ. Chem.* 94, 252–261.
- Rocha, M.J., Cruzeiro, C., Reis, M., Pardal, M.A., Rocha, E., 2014. Spatial and seasonal distribution of 17 endocrine disruptor compounds in an urban estuary (Mondego River, Portugal): evaluation of the estrogenic load of the area. *Environ. Monitor. Assess.* 186, 3337–3350.
- Salgueiro-González, N., Concha-Graña, E., Turnes-Carou, I., Muniategui-Lorenzo, S., Lopez-Mahia, P., Prada-Rodríguez, D., 2012a. Blank and sample handling troubleshooting in ultratrace analysis of alkylphenols and bisphenol A by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Talanta* 101, 413–419.
- Salgueiro-González, N., Concha-Graña, E., Turnes-Carou, I., Muniategui-Lorenzo, S., López-Mahía, P., Prada-Rodríguez, D., 2012b. Determination of alkylphenols and bisphenol A in seawater samples by dispersive liquid–liquid microextraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry for compliance with Environmental Quality Standards (Directive 2008/105/EC). *J. Chromatogr. A* 1223, 1–8.
- Salgueiro-González, N., Turnes-Carou, I., Muniategui-Lorenzo, S., Lopez-Mahia, P., Prada-Rodríguez, D., 2012c. Fast and selective pressurized liquid extraction with simultaneous in cell clean up for the analysis of alkylphenols and bisphenol A in bivalve molluscs. *J. Chromatogr. A* 1270, 80–87.
- Salgueiro-González, N., Lopez de Alda, M., Muniategui-Lorenzo, S., Prada-Rodríguez, D., Barcelo, D., 2013. Determination of 13 estrogenic endocrine disrupting compounds in atmospheric particulate matter by pressurized liquid extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 405, 8913–8923.
- Salgueiro-González, N., Turnes-Carou, I., Muniategui-Lorenzo, S., López-Mahía, P., Prada-Rodríguez, D., 2014. Analysis of endocrine disruptor compounds in marine sediments by in cell clean-up pressurized liquid extraction–liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 852, 112–120.
- Silva, L.J.G., Pereira, A.M.P.T., Meisel, L.M., Lino, C.M., Pena, A., 2014. A one-year follow-up analysis of antidepressants in Portuguese wastewaters: occurrence and fate, seasonal influence, and risk assessment. *Sci. Total Environ.* 490, 279–287.
- Sousa, R., Dias, S.C., Guilhermino, L., Antunes, C., 2008a. Minho River tidal freshwater wetlands: threats to faunal biodiversity. *Aquatic Biol.* 3, 237–250.
- Sousa, R., Rufino, M., Gaspar, M., Antunes, C., Guilhermino, L., 2008b. Abiotic impacts on spatial and temporal distribution of *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) in the River Minho Estuary, Portugal. *Aquat. Conserv.* 18, 98–110.
- Vale, C., Raimundo, J., Caetano, M., 2014. Assessing pressures of anthropogenic activities and physico-chemical status according to the Water Framework Directive in the Minho River estuary. TeamMinho Project (Entregable A2E1_ms_Pressures, 15 pp.).
- Wang, B., Huang, B., Jin, W., Zhao, S.M., Li, F.R., Hu, P., et al., 2013. Occurrence, distribution, and sources of six phenolic endocrine disrupting chemicals in the 22 river estuaries around Dianchi Lake in China. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 3185–3194.
- Wetzel, M.A., Wahrendorf, D.-S., von der Ohe, P.C., 2013. Sediment pollution in the Elbe estuary and its potential toxicity at different trophic levels. *Sci. Total Environ.* 449, 199–207.
- Wright-Walters, M., Volz, C., Talbott, E., Davis, D., 2011. An updated weight of evidence approach to the aquatic hazard assessment of bisphenol A and the derivation of a new predicted no effect concentration (PNEC) using a non-parametric methodology. *Sci. Total Environ.* 409, 676–685.
- Ying, G.G., Williams, B., Kookana, R., 2002. Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates – a review. *Environ. Int.* 28, 215–226.
- Zhang, X., Gao, Y., Li, Q., Li, G., Guo, Q., Yan, C., 2011a. Estrogenic compounds and estrogenicity in surface water, sediments, and organisms from Yundang Lagoon in Xiamen, China. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 61, 93.
- Zhang, Z., Rhin, S.M., Kerr, C., Osprey, M., Kyle, C.E., 2011b. Selective pressurized liquid extraction of estrogenic compounds in soil and analysis by gas chromatography–mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 685, 29–35.
- Zhang, Z., Ren, N., Kannan, K., Nan, J., Liu, L., Ma, W., et al., 2014. Occurrence of endocrine-disrupting phenols and estrogens in water and sediment of the Songhua River, north-eastern China. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 66, 361–369.
- Zhou, Z., Liang, Y., Shi, Y., Xu, L., Cai, Y., 2013. Occurrence and transport of perfluoroalkyl acids (PFAAs), including short-chain PFAAs in Tangxun Lake, China. *Environ. Sci. Technol.* 47, 9249–9257.

Supplementary Material

OCCURRENCE, DISTRIBUTION AND BIOACCUMULATION OF ENDOCRINE DISRUPTING COMPOUNDS IN WATER, SEDIMENT AND BIOTA SAMPLES FROM A EUROPEAN RIVER BASIN

N. Salgueiro-González^a, I. Turnes-Carou^a, V. Besada^b, S. Muniategui-Lorenzo^{a*}, P. López-Mahía^a, D. Prada-Rodríguez^a,

^a. Grupo Química Analítica Aplicada (QANAP), Instituto Universitario de Medio Ambiente (IUMA), Centro de Investigaciones Científicas Avanzadas (CICA), Departamento de Química Analítica, Facultade de Ciencias, Universidade da Coruña, Campus de A Coruña, E-15071 A Coruña, Spain.

^b. Centro Oceanográfico de Vigo, Instituto Español de Oceanografía, IEO, Subida a Radio Faro, 50, 36390, Vigo, Spain.

No of pages: 11

Tables: 6

Figures: 1

2

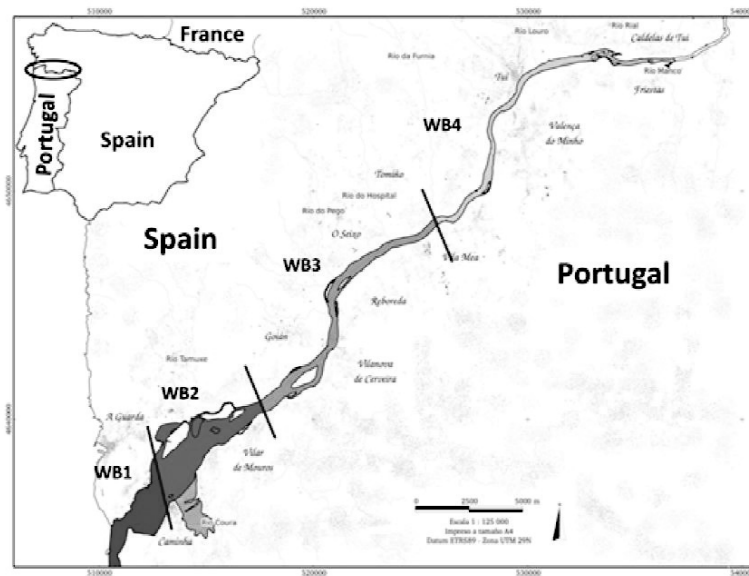


Table S1. Physico-chemical parameters of the water column measured in spring and autumn seasons (2012)

Sampling point	Depth (m)	Temperature (°C)	Conductivity (mS cm ⁻¹)	TDS (mg L ⁻¹)	Dissolved oxygen (mg L ⁻¹)	pH	Salinity (‰)
<i>May 2012 (Spring season)</i>							
TM01ht	1	16.7	6.8	7.6	8.4	7.2	4.5
TM01lt	1	18.0	44	87	7.25	8.1	34
TM02ht	5	20.2	1.8	21	7.96	7.6	1.1
TM02lt	3	18.8	0.087	1.8	9.5	7.6	0.050
TM03ht	6	18.4	0.41	7.2	6.94	7.6	23
TM03lt	4	17.6	0.081	5.0	10.12	7.2	0.040
TM04ht	12	14.3	0.11	7.2	9.75	7.2	0.070
TM04lt	8	21.4	0.089	2.4	9.2	7.6	0.040
TM05ht	5	14.6	0.080	6.8	9.41	7.6	0.050
TM05lt	2	18.4	0.079	3.6	9.98	7.5	0.040
TM06	1	17.9	0.099	14	6.8	7.0	0
TM07	1	18.9	0.17	11	7.6	7.7	0.10
TM8	1	14.0	0.050	11	8.1	7.2	0.029
<i>November 2012 (Autumn season)</i>							
TM01ht	-	15.7	43	32	7.14	8.3	35
TM01lt	-	12.8	18	15	7.5	7.9	11
TM02ht	-	13.0	4.8	7.3	4.58	7.8	3.4
TM02lt	3	12.3	0.085	5.4	-	7.6	0.050
TM03ht	-	12.6	0.27	4.0	4.14	7.6	0.17
TM03lt	3.5	12.5	0.078	4.4	-	7.3	0.050
TM04ht	7	12.4	0.082	1.7	8.77	-	0.050
TM04lt	5	12.4	0.082	2.6	4.89	-	0.050
TM05ht	6	12.5	0.081	3.4	5.54	-	0.050
TM05lt	4.5	12.4	0.081	1.9	5.86	-	0.070
TM06	-	11.2	0.152	8.3	8.6	7.3	0.070
TM07	-	11.2	0.222	7.7	7.7	6.1	0.010
TM8	-	11.2	0.060	4.1	8	7.0	0

Table S2. Characterization of sediment samples collected in spring season (2012)

Sampling point	Sediment type	Sediment characteristics: % particles < 0.063 mm
TM01	Sand	0.7
TM02	Sand	0.2
TM03	Sand	0.1
TM04	Sand	0.2
TM05	Sand+ sludge	28
TM06	Sand	0.3
TM07	Sand	1.6
TM08	Sand	2.8
TM09	Fine sand	18
TM10	Sand	3.1
TM11	Sand	7.3
TM12	Sand	2.9
TM13	Fine sand	12.6
TM14	Sand	3.7
TM15	Sand+ sludge	47
TM16	Sand+ sludge	31
TM17	Sand + sludge	13
TM18	Sand + sludge	31
TM19	Sand + sludge	7.8
TM20	Sand	4.6
TM21	Sand + sludge	16
TM22	Sand + sludge	11

Table S3. Levels of APs and BPA ($\mu\text{g L}^{-1}$) in river waters found in the literature

Location	Concentration ($\mu\text{g L}^{-1}$)					Ref
	4-tOP	4-m-OP	4-m-NP	NP	BPA	
Minho River (Iberian Peninsula)	<0.088	<0.012	<0.006	<0.030-1.03	<0.020-4.8	This Study
22 rivers						
Dianchi Lake (China)	<0.073	NA	0.005-0.057	NA	0.035-1.081	[Wang <i>y cols.</i> , 2013]
4 Iberian rivers	<0.085	NA	NA	< 0.391	< 0.649	[Gorga <i>y cols.</i> , 2015]
Mondego River (Portugal)	<27.50	<1.279	0.021-2.770	0.081-1.003	<0.182	[Rocha <i>y cols.</i> , 2014]
Songhua River (China)	<0.046	NA	<0.0037	0.106-0.344	0.008-0.263	[Zhang <i>y cols.</i> , 2014]
Llobregat River (Spain)	<0.88	NA	NA	0.02-0.53	NA	[Brix <i>y cols.</i> , 2010]
Douro River (Iberian Peninsula)	<0.024	<0.014	0.011-0.012	NA	0.034-0.060	[Rocha <i>y cols.</i> , 2012]
Daliao River Estuary (China)	NA	NA	NA	0.083-0.777	NA	[Li <i>y cols.</i> , 2013]
Ter River (Spain)	<0.24	NA	NA	<0.07-5.67	<0.05-1.51	[Céspedes <i>y cols.</i> , 2006]
Ibaizabal River (Spain)	<0.392	0.237	NA	<1379	< 0.129	[Iparraguirre <i>y cols.</i> , 2012]
Lakes of Sri Lanka	NA	NA	NA	0.03-1835	NA	[Guruge <i>y cols.</i> , 2011]
Masan Bay (Korea)	NA	NA	NA	0.023-0.928	NA	[Li <i>y cols.</i> , 2008]
Venice lagoon (Italy)	NA	NA	NA	<0.211	<0.136	[Pojana <i>y cols.</i> , 2007]
San Francisco Bay (USA)	NA	NA	NA	< 0.073	NA	[Klosterhaus <i>y cols.</i> , 2013]

NA:Not analyzed

Table S4. Levels of APs and BPA (ng g⁻¹) in river sediments found in the literature

Location	Concentration (ng g ⁻¹)					Ref
	4-tOP	4-n-OP	4-n-NP	NP	BPA	
Minho River (Iberian Peninsula)	<MQL-74.5	<MQL-2.4	<MQL-1.7	<MQL-4460	<MQL-130	This Study
Songhua River (China)	0.00014-0.0017	NA	< 0.0025	0.011-0.117	0.0015-0.017	[Zhang <i>y cols.</i> , 2014]
4 Iberian rivers	<MQL-76	NA	NA	<MQL-1693	<MQL-117	[Gorga <i>y cols.</i> , 2015]
Llobregat River (Spain)	<MQL-3	NA	NA	2-79	NA	[Brix <i>y cols.</i> , 2010]
Catalonia (Spain)	NA	NA	NA	10-1050	NA	[Petrovic <i>y cols.</i> , 2002]
Venice lagoon (Italy)	NA	NA	NA	47-200	2-118	[Pojana <i>y cols.</i> , 2007]
Dutch estuaries (Germany)	NA	NA	NA	<0.4-1080	NA	[Jonkers <i>y cols.</i> , 2005]
Cuyahoga River (USA)	NA	NA	NA	75-340	NA	Rice <i>y cols.</i> , 2003
Corea Rivers	NA	NA	NA	10.4-5054	NA	Li <i>y cols.</i> , 2004
South of China	1-18	NA	NA	60-571	NA	[Chen <i>y cols.</i> , 2005]
South of California(USA)	<MQL-8.2	NA	NA	122-3200	NA	[Schlenk <i>y cols.</i> , 2005]
Yeongil Bay (Corea)	1-24	NA	NA	3-1430	<1-191	[Koh <i>y cols.</i> , 2006]
Great Lakes (Canada)	<MQL-52	NA	NA	<MQL-1750	NA	[Mayer <i>y cols.</i> , 2007]
Masan Bay, Korea	NA	NA	NA	130-2810	NA	[Li <i>y cols.</i> , 2008]
Daliao River Estuary (China)	NA	NA	NA	1.5-456	NA	[Li <i>y cols.</i> , 2013]
Anzali Wetland (Iran)	10-1260	NA	NA	50-29000	10-6970	[Mortazavi <i>y cols.</i> , 2012]
San Francisco Bay (USA)	NA	NA	NA	21.5-86.3	NA	[Klosterhaus <i>y cols.</i> , 2013]

NA:Not analyzed

Table S5. Levels of APs and BPA (ng g⁻¹) in biota found in the literature

Location	Species	Concentration (ng g ⁻¹)					Ref
		4-tOP	4-n-OP	4-n-NP	NP	BPA	
MinhoRiver (Iberian Peninsula)	<i>C.fluminea</i>	<2.6-112.1	<1.7-15.2	<2.3-24.5	306-2258	<3.3-412	This Study
Galician coast (NW Spain)	Mussel	9-31	<1.7	<2.3	9-372	<3.3-11.2	[Salgueiro-González <i>y cols.</i> , 2012]
Masan Bay (Korea)	Mussel	NA	NA	NA	50.5-289.2	NA	[Wang <i>y cols.</i> , 2007]
Lakes of Germany	Mussels	0.3-0.6	NA	NA	<2-15	NA	[Wenzel <i>y cols.</i> , 2004]
Venice lagoon (Italy)	Mussel	NA	NA	NA	115-240	<MQL	[Pojana <i>y cols.</i> , 2007]
Catalonia (NE Spain)	Mussel	6.9	NA	NA	16-58	NA	[Sánchez-Avila <i>y cols.</i> , 2011]
Adriatic Sea (Italy)	Cuttlefish	3.6-4.4			67-566		
	Clams	2.7-2.8	NA	NA	243-265	NA	[Ferrara <i>y cols.</i> , 2001]
	Mussel	4.4-4.9			254-265		
	Squid	3.6-18.6			389-696		
South Asia	Mussel	1.8-26.8	NA	NA	18-643	1.1-13.7	[Isobe <i>y cols.</i> , 2007]
Masan Bay (Korea)	Mussel	NA	NA	NA	51-290	NA	[Li <i>y cols.</i> , 2008]
San Francisco Bay (USA)	Mussel	NA	NA	NA	<MQL-94.5	NA	[Klosterhaus <i>y cols.</i> , 2013]
Taiwan coast	Oyster	20-1460	NA	NA	130-5190	NA	[Cheng <i>y cols.</i> , 2006]
	Snail	21-1370			66-3910		

NA:Not analyzed

Table S6. Bioaccumulation factor (BAF) in L Kg⁻¹ (a) and logarithm biota-sediment accumulation factor (log BSAF) (b) measured for the target compounds in different species

Species	Location	BAF (L Kg ⁻¹)			Reference
		4-tOP	NP	BPA	
<i>C. fluminea</i>	Minho River (May)	439 ± 0.161	2788 ± 83.8	-	This study
	Minho River (November)	-	3649 ± 131.5	-	This study
<i>Daphia magna</i>	Laboratory study	-	468-46357	-	[Preuss y cols., 2008]
Algae Carp, <i>Cyprinus carpio</i> <i>Linnaeus</i>	Pearl River Delta (China)	482-7251	131-740	2846-12979	[Yang y cols., 2014]
		1500-12960	1648-11137	3583-14178	
<i>Stephanidiscus hantzschii</i>	Laboratory study	-	-	100-500	[Li y cols., 2009]
Mediterranean mussel <i>Mytilus galloprovincialis</i>	Aegean Sea (Greece)	-	-	4500	[Gatidou y cols., 2010]
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Laboratory study	100-1190	-	-	[Ferreira-Leach y cols., 2001]
<i>Oreochromis niloticus</i>	Dan-SHui River, Taiwan	-	967-27287	-	[Chen y cols., 2014]
Copepod, <i>Eurytemora affinis</i>	Laboratory study	-	324	-	[Cailleaud y cols., 2011]
Fish	Laboratory study	307-748	-	-	[Gadzala-Kopciuch y cols., 2009]
<i>Zebra fish</i>	China	-	1440	-	[Huang y cols., 2007]
Manila clam, <i>Tapes philippinarum</i>	Lagoon Venice	-	1009-2067	-	[Lietti y cols., 2007]

Species	Location	Log BSAF		Reference
		4-tOP	NP	
<i>C. fluminea</i>	Minho River (May)	1.56 ± 0.43	2.6 ± 0.97	This study
Amphipod species <i>Eohaustrius estuaries</i> , <i>Grandidierella japonica</i> , <i>Corophium salmonis</i>	Laboratory studies	-	4.6-33.9 (BSAF)	[Hecht y cols., 2004]
<i>Ruditapes philippinarum</i> <i>Sparus latus</i> <i>Acanthopagrus schlegel</i>	Yundang Lagoon, China	-	0.05-0.40	[Zhang y cols., 2011]

REFERENCES

- Brix, R., Postigo, C., Gonzalez, S., Villagrasa, M., Navarro, A., Kuster, M., de Alda, M.J.L., Barcelo, D. *Analysis and occurrence of alkylphenolic compounds and estrogens in a European river basin and an evaluation of their importance as priority pollutants*, *Anal Bioanal Chem* (2010) 396, 1301-1309.
- Cailleaud, K., Budzinski, H., Lardy, S., Augagneur, S., Barka, S., Souissi, S., Forget-Leray, J. *Uptake and elimination, and effect of estrogen-like contaminants in estuarine copepods: an experimental study*, *Environ Sci Pollut Res* (2011) 18, 226-236.
- Céspedes, R., Lacorte, S., Ginebreda, A., Barcelo, D. *Chemical monitoring and occurrence of alkylphenols, alkylphenol ethoxylates, alcohol ethoxylates, phthalates and benzothiazoles in sewage treatment plants and receiving waters along the Ter River basin (Catalonia, N. E. Spain)*, *Anal Bioanal Chem* (2006) 385, 992-1000.
- Chen, B., Mai, B.X., Duan, J.C., Luo, X.J., Yang, Q.S., Sheng, G.Y., Fu, J.M. *Concentrations of alkylphenols in sediments from the Pearl River estuary and South China Sea, South China*, *Marine Poll Bull* (2005) 50, 993-997.
- Chen, W.L., Gwo, J.C., Wang, G.S., Chen, C.Y. *Distribution of feminizing compounds in the aquatic environment and bioaccumulation in wild tilapia tissues*, *Environ Sci Pollut Res* (2014) 21, 11349-11360.
- Cheng, C.-Y., Liu, L.-L., Ding, W.-H. *Occurrence and seasonal variation of alkylphenols in marine organisms from the coast of Taiwan*, *Chemosphere* (2006) 65, 2152.
- Ferrara, F., Fabietti, F., Delise, M., Bocca, A.P., Funari, E. *Alkylphenolic compounds in edible molluscs of the Adriatic Sea (Italy)*, *Environ Sci Technol* (2001) 35, 3109-3112.
- Ferreira-Leach, A.M.R., Hill, E.M. *Bioconcentration and distribution of 4-tert-octylphenol residues in tissues of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)*, *Marine Environ Res* (2001) 51, 75-89.
- Gadzala-Kopciuch, R., Filipiak, A., Berecka, B., Gomuka, P., Buszewski, B. *Selection of Extraction Method for the Estimation of the Bioaccumulation Factor of 4-N-Nonylphenol and 4-Tert-Octylphenol in an Aquatic System*, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* (2009) 32, 971-983.
- Gatidou, G., Vassalou, E., Thomaidis, N.S. *Bioconcentration of selected endocrine disrupting compounds in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis**, *Marine Pollut Bull* (2010) 60, 2111-2116.
- Gorga, M., Insa, S., Petrovic, M., Barcelo, D. *Occurrence and spatial distribution of EDCs and related compounds in waters and sediments of Iberian rivers*, *Sci. Total Environ.* (2015) 503, 69-86.
- Guruge, K., Horii, Y., Yamashita, N. *Profiles of nonylphenol isomers in surface waters from Sri Lanka*, *Marine Poll Bull* (2011) 62, 870-873.
- Hecht, S.A., Gunnarsson, J.S., Boese, B.L., Lamberson, J.O., Schaffner, C., Giger, W., Jepson, P.C. *Influences of sedimentary organic matter quality on the bioaccumulation of 4-nonylphenol by estuarine amphipods*, *Environ Toxicol Chem* (2004) 23, 865-873.
- Huang, G.L., Hou, S.G., Wang, L., Sun, H.W. *Distribution and fate of nonylphenol in an aquatic microcosm*, *Water Res* (2007) 41, 4630-4638.
- Iparraguirre, A., Navarro, P., Prieto, A., Rodil, R., Olivares, M., Fernandez, L.-A., Zuloaga, O. *Membrane-assisted solvent extraction coupled to large volume injection-gas chromatography-mass spectrometry for the determination of a variety of endocrine disrupting compounds in environmental water samples*, *Anal Bioanal Chem* (2012) 402, 2897-2907.
- Isobe, T., Takada, H., Kanai, M., Tsutsumi, S., Isobe, K.O., Boonyatumanond, R., Zakaria, M.P. *Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and phenolic endocrine disrupting*

- chemicals in south and southeast Asian mussels, *Environ Monitor Assess* (2007) 135, 423-440.
- Jonkers, N., Laane, R., de Graaf, C., de Voogt, P. *Fate modeling of nonylphenol ethoxylates and their metabolites in the Dutch Scheldt and Rhine estuaries: validation with new field data*, *Estuar Coast Shelf Sci* (2005) 62, 141-160.
- Klosterhaus, S.L., Grace, R., Hamilton, M.C., Yee, D. *Method validation and reconnaissance of pharmaceuticals, personal care products, and alkylphenols in surface waters, sediments, and mussels in an urban estuary*, *Environ Int* (2013) 54, 92-99.
- Koh, C.H., Khim, J.S., Villeneuve, D.L., Kannan, K., Giesy, J.P. *Characterization of trace organic contaminants in marine sediment from Yeongil Bay, Korea: 1. Instrumental analyses*, *Environ Pollut* (2006) 142, 39-47.
- Li, D., Dong, M., Shim, W.J., Yim, U.H., Hong, S.H., Kannan, N. *Distribution characteristics of nonylphenolic chemicals in Masan Bay environments, Korea*, *Chemosphere* (2008) 71, 1162-1172.
- Li, J., Fu, J., Zhang, H., Li, Z., Ma, Y., Wu, M., Liu, X. *Spatial and seasonal variations of occurrences and concentrations of endocrine disrupting chemicals in unconfined and confined aquifers recharged by reclaimed water: A field study along the Chaobai River, Beijing*, *Sci. Total Environ.* (2013) 450, 162-168.
- Li, R., Chen, G.-Z., Tam, N.F.Y., Luan, T.-G., Shin, P.K.S., Cheung, S.G., Liu, Y. *Toxicity of bisphenol A and its bioaccumulation and removal by a marine microalga *Stephanodiscus hantzschii**, *Ecotoxicol Environ Saf* (2009) 72, 321-328.
- Lietti, E., Marin, M.G., Matozzo, V., Polesello, S., Valsecchi, S. *Uptake and elimination of 4-nonylphenol by the clam *Tapes philippinarum**, *Arch Environ Contam Toxicol* (2007) 53, 571-578.
- Mayer, T., Bennie, D., Rosa, F., Rekas, G., Palabrica, V., Schachtschneider, J. *Occurrence of alkylphenolic substances in a Great Lakes coastal marsh, Cootes Paradise, ON, Canada*, *Environ Pollut* (2007) 147, 683-690.
- Mortazavi, S., Bakhtiari, A.R., Sari, A.E., Bahramifar, N., Rahbarizade, F. *Phenolic endocrine disrupting chemicals (EDCs) in Anzali Wetland, Iran: Elevated concentrations of 4-nonylphenol, octylphenol and bisphenol A*, *Marine Poll Bull* (2012) 64, 1067-1073.
- Petrovic, M., Eljarrat, E., de Alda, M.J.L., Barcelo, D. *Recent advances in the mass spectrometric analysis related to endocrine disrupting compounds in aquatic environmental samples*, *J Chromatogr A* (2002) 974, 23-51.
- Pojana, G., Gomiero, A., Jonkers, N., Marcomini, A. *Natural and synthetic endocrine disrupting compounds (EDCs) in water, sediment and biota of a coastal lagoon*, *Environ Int* (2007) 33, 929.
- Preuss, T.G., Telscher, M., Ratte, H.T. *Life stage- dependent bioconcentration of a nonylphenol isomer in *Daphnia magna**, *Environ. Pollut.* (2008) 156, 1211-1217.
- Rocha, M.J., Cruzeiro, C., Ferreira, C., Rocha, E. *Occurrence of endocrine disruptor compounds in the estuary of the Iberian Douro River and nearby Porto Coast (NW Portugal)*, *Toxicol Environ Chem* (2012) 94, 252-261.
- Rocha, M.J., Cruzeiro, C., Reis, M., Pardal, M.A., Rocha, E. *Spatial and seasonal distribution of 17 endocrine disruptor compounds in an urban estuary (Mondego River, Portugal): evaluation of the estrogenic load of the area*, *Environ Monitor Assess* (2014) 186, 3337-3350.
- Salgueiro-González, N., Turnes-Carou, I., Muniategui-Lorenzo, S., Lopez-Mahia, P., Prada-Rodriguez, D. *Fast and selective pressurized liquid extraction with simultaneous in cell clean*

- up for the analysis of alkylphenols and bisphenol A in bivalve molluscs, *J Chromatogr A* (2012) 1270, 80-87.
- Sánchez-Avila, J., Fernandez-Sanjuan, M., Vicente, J., Lacorte, S. *Development of a multi-residue method for the determination of organic micropollutants in water, sediment and mussels using gas chromatography-tandem mass spectrometry*, *J Chromatogr A* (2011) 1218, 6799.
- Schlenk, D., Sapozhnikova, Y., Irwin, M.A., Xie, L.T., Hwang, W., Reddy, S., Brownawell, B.J., Armstrong, J., Kelly, M., Montagne, D.E., Kolodziej, E.P., Sedlak, D., Snyder, S. *In vivo bioassay-guided fractionation of marine sediment extracts from the Southern California Bight, USA, for estrogenic activity*, *Environ Toxicol Chem* (2005) 24, 2820-2826.
- Vale, C., Raimundo, J., Caetano, M. *Assessing pressures of anthropogenic activities and physico-chemical status according to the Water Framework Directive in the Minho River estuary, TeamMinho Project. Entregable A2E1_ms_Pressures* (2014) 15pp.
- Wang, B., Huang, B., Jin, W., Zhao, S.M., Li, F.R., Hu, P., Pan, X.J. *Occurrence, distribution, and sources of six phenolic endocrine disrupting chemicals in the 22 river estuaries around Dianchi Lake in China*, *Environ Sci Poll Res* (2013) 20, 3185-3194.
- Wang, J., Dong, M., Shim, W.J., Kannan, N., Li, D. *Improved cleanup techniques for gas chromatographic-mass spectrometric determination of alkylphenols from biota extract*, *J Chromatogr A* (2007) 1171, 15-21.
- Wenzel, A., Bohmer, W., Muller, J., Rudel, H., Schroter-Kermani, C. *Retrospective monitoring of alkylphenols and alkylphenol monoethoxylates in aquatic biota from 1985 to 2001: Results from the German Environmental Specimen Bank*, *Environ Sci Technol* (2004) 38, 1654-1661.
- Yang, J., Li, H., Ran, Y., Chan, K. *Distribution and bioconcentration of endocrine disrupting chemicals in surface water and fish bile of the Pearl River Delta, South China*, *Chemosphere* (2014) 107, 439-446.
- Zhang, X., Gao, Y.J., Li, Q.Z., Li, G.X., Guo, Q.H., Yan, C.Z. *Estrogenic Compounds and Estrogenicity in Surface Water, Sediments, and Organisms from Yundang Lagoon in Xiamen, China*, *Arch Environ Contam Toxicol* (2011) 61, 93-100.
- Zhang, Z., Ren, N., Kannan, K., Nan, J., Liu, L., Ma, W., Qi, H., Li, Y. *Occurrence of Endocrine-Disrupting Phenols and Estrogens in Water and Sediment of the Songhua River, Northeastern China*, *Arch Environ Contam Toxicol* (2014) 66, 361-369.

ANEXO IX

Determination of 13 estrogenic endocrine disrupting compounds
in atmospheric particulate matter by pressurised liquid extraction
and liquid chromatography-tandem mass spectrometry

Anal Bioanal Chem (2013) 405, 8913-8923

Determination of 13 estrogenic endocrine disrupting compounds in atmospheric particulate matter by pressurised liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry

N. Salgueiro-González · M. López de Alda ·
S. Muniategui-Lorenzo · D. Prada-Rodríguez ·
Damià Barceló

Received: 29 May 2013 / Revised: 2 August 2013 / Accepted: 8 August 2013 / Published online: 5 September 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Abstract This paper describes the optimisation of an analytical method for the simultaneous determination of up to 13 estrogenic endocrine disrupting compounds (EDCs), including natural and synthetic estrogens, alkylphenols, bisphenol A and phthalate esters, in atmospheric particulate matter. This methodology is based on pressurised liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry and is the first method described for analysis of estrogens in air. Samples were collected with high-volume samplers equipped with quartz microfiber filters. Two selected reaction monitoring transitions were chosen for identification and confirmation of the target compounds. Quantitation was performed by the internal standard method with the use of deuterated surrogate

standards. The analytical features of the method were satisfactory: absolute recoveries were around 45 % for all compounds, except estrogens (~29 %), because of matrix effects. Repeatability was in all cases below 15 %. Quantitation limits of the method ranged from 5 pg/m³ (for diethylphthalate) to 83 pg/m³ (for 17- α -ethynylestradiol). As a part of the validation procedure, the developed method was applied to the analysis of eight air particulate samples (fine grain-size particles, PM_{2.5}) collected in industrial, urban and non-polluted suburban areas of A Coruña (NW of Spain). Results evidenced the presence of dibutylphthalate, diethylhexylphthalate and nonylphenol in all samples. The highest concentration corresponded to dibutylphthalate (54.7 ng/m³) in an industrial area. Daily exposure to these EDCs in terms of estradiol equivalents (3 pg/day for toddlers and 5 pg/day for adults) is not expected to pose a risk to human health.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00216-013-7298-y) contains supplementary material, which is available to authorized users.

N. Salgueiro-González · S. Muniategui-Lorenzo ·
D. Prada-Rodríguez
Department of Analytical Chemistry, University of A Coruña,
Campus da Zapateira, Rua da Fraga 10, 15008 A Coruña, Spain

M. López de Alda (✉) · D. Barceló
Water and Soil Quality Research Group, Department of
Environmental Chemistry, Institute of Environmental Assessment
and Water Research (IDAEA-CSIC), Jordi Girona 18-26,
08034 Barcelona, Spain
e-mail: mlaqam@cid.csic.es

D. Prada-Rodríguez
University Institute of Environment, Pazo de Lóngora, Liáns,
Oleiros, 15179 A Coruña, Spain

D. Barceló
Catalan Institute for Water Research (ICRA), Parc Científic i
Tecnològic de la Universitat de Girona, Emili Grahit, 101,
Edifici H2O, 17003 Girona, Spain

Keywords Atmospheric particulate matter · Steroid sex hormones · Phthalate esters · Alkylphenols · Bisphenol A · Estrogenicity

Introduction

Epidemiological studies have demonstrated a significant correlation between atmospheric particulate matter (APM) concentration and public health [1]. Consequently, the analytical characterisation of the atmospheric aerosol composition is crucial, especially the inhalable fraction (PM_{2.5}) which can penetrate into the respiratory system and be deposited into the lungs [2].

In the last years, trace metals and polycyclic aromatic hydrocarbons have been widely investigated in air because of their incorporation into the legislation (Directive 2004/107/

EC). However, other organic pollutants, such as semivolatile endocrine disrupting compounds (EDCs), could be associated to the APM despite their physical–chemical properties (low vapour pressures, medium polarity and molecular weights lower than 300 amu) and should therefore be investigated as well.

To the authors' knowledge, very few papers have addressed the analysis of semivolatile EDCs in air. These studies included the analysis of estrogenic-like compounds, such as alkylphenols, bisphenol A and phthalate esters, which can have a negative effect on human reproduction acting on estrogens receptors ER α and ER β [3]. However, the occurrence of steroid sex hormones (considering under this category both natural hormones and synthetic estrogens) has never been investigated.

In 2003, Rudel et al. [4] proposed the first method for analysis of EDCs in APM, based on Soxhlet extraction followed by analysis of the extracts by gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS).

All the methods developed so far are based on simultaneous GC-MS determination of various EDCs [5–10]. However, a derivatisation step is required for the analysis of some of these compounds. Therefore, liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) appears as a convenient tool for avoiding losses of analytes and simplifying the experimental process. Other advantages of LC-MS/MS are sensitivity, selectivity, and the use of atmospheric pressure ionisation techniques which allow soft ionisation with little fragmentation of a wide range of compounds [11].

Classical extraction techniques such as Soxhlet and sonication were employed in the air analysis of the EDCs mentioned earlier. These techniques require large volumes of solvents, long extraction times, and most often a subsequent clean-up step to purify further the extracts obtained. Nowadays, alternative techniques such as pressurised liquid extraction (PLE) are replacing classical techniques because of the better extraction efficiency and the lower volumes of toxic solvents required. Furthermore, the choice of an adequate extraction solvent can avoid the tedious clean-up step, reducing the analysis time.

In this context, the main objectives of this work were: (1) to develop and validate an analytical methodology based on PLE and LC-MS/MS for the simultaneous analysis of 13 estrogenic EDCs (including for the first time steroid sex hormones) in APM; (2) to apply this methodology to the analysis of real samples to get a first picture about the presence of these compounds in different suburban, urban and industrial areas in NW Spain; and (3) to estimate the estrogenic activity of the samples to obtain a first idea of the daily exposure to these compounds via air and evaluate possible damage to human health.

Experimental section

Chemicals A total of 13 EDCs belonging to 4 different groups were investigated: three natural sex hormones (17- β -estradiol

(E2) and its metabolites estrone (E1) and estriol (E3)) and two synthetic estrogens (17- α -ethynylestradiol (EE2), used as contraceptive and diethylstilbestrol (DES), used fraudulently as growth promoter in the beef and poultry industries); three alkylphenols (the non-ionic surfactants 4-tert-octylphenol (tOP), 4-*n*-nonylphenol (4nNP) and the technical mixture nonylphenol (NP)); bisphenol A (BPA), used in the production of epoxi resins; and four phthalate esters (dimethylphthalate (DMP), diethylphthalate (DEP), dibutylphthalate (DBP) and diethylhexylphthalate (DEHP)), used mainly as plasticisers in the production of polyvinylchloride and as fixatives in perfumes. The molecular structure, Chemical Abstract Service number and molecular weight for all compounds are shown in Fig. S1 (Electronic supplementary material). High purity (>97 %) standards of the target analytes were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Isotopically labelled compounds were used as surrogate standards for quantitation. Estrone-2,4,16,16- d_4 (E1- d_4), 17- β -estradiol 2,4,16,16,17- d_5 (E2- d_5), estriol-2,3,4-13- d_3 (E3- d_3), bisphenol A- d_{16} (BPA- d_{16}), dimethylphthalate-3,4,5,6- d_4 (DMP- d_4), diethylphthalate-3,4,5,6- d_4 (DEP- d_4), dibutylphthalate-3,4,5,6- d_4 (DBP- d_4), bis(2-ethylhexyl) phthalate-3,4,5,6- d_4 (DEHP- d_4) and a solution of 4-tert-octylphenol-3,5- d_2 (tOP- d_2) in acetone (1 mg/L) were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany); 17- α -ethynylestradiol-2,4,16,16- d_4 (EE2- d_4) and a solution of 4-*n*-nonylphenol- d_8 (4nNP- d_8) in acetone (100 mg/L) were obtained from Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany).

Individual stock solutions at 1 mg/mL and working standard mixtures at concentrations ranging from 0.1 ng/mL to 1 μ g/mL were prepared by appropriate dilution of the standards in methanol (concentration of internal standards 20 ng/mL) and were stored at -20°C in the dark. All solvents (HPLC-grade methanol, acetonitrile and water) and analytical-grade acetic acid (CH₃CO₂) were acquired from Merck (Darmstadt, Germany).

Analytical instrumentation Extraction of the target analytes from the air sampling filters was performed by PLE using an accelerated solvent extraction system ASE 200 (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) equipped with stainless steel extraction cells (11 mL, Dionex) and glass-fibre filters (\varnothing 19.8 mm; Dionex).

LC-MS/MS analyses were carried out in a system consisting of a Waters 2690 series Alliance HPLC (Waters; Milford, MA) with a quaternary pump equipped with a 120-vial capacity sample management system and connected with a triple quadrupole mass spectrometer LC Quattro from Micromass (Manchester, UK) equipped with a pneumatically assisted electrospray probe and a Z-spray interface.

APM sample collection APM PM_{2.5} (aerodynamic diameter equal or lower than 2.5 μ m) was collected on quartz

microfiber filters (15 cm diameter; Munktell, Falun, Sweden) using high-volume samplers (Digitel and MCV) at flow rate of 30 m³/h during 24 h.

Filters were previously pre-heated at 400 °C for 12 h and then conditioned for 48 h at constant temperature (20±1 °C) and relative humidity (50±5 %) before weighing, according to EN 12341 European Norm [12]. After sampling, filters were conditioned in the same way as above and weighed again.

A total of eight samples were collected from three different areas of A Coruña (NW Spain): an industrial area (Sabón, 43.32° N, 8.50° W), an urban area (A Coruña, 43.38° N, 8.41° W) and a non-polluted suburban area (University Institute of Environment, Oleiros, 43.2° N, 8.17° W). Thus, several pollution sources such as local industries, vehicular emissions and natural inputs were considered.

After collection, PM_{2.5} samples were stored in a freezer (−18 °C) until analysis.

Sample extraction To ensure that the analysed sample was representative, six circular portions (11.3 cm²) were cut from the PM_{2.5} air filters using a hollow and sharp-edged steel cylinder (Selecta, Barcelona, Spain), placed in a PLE cell with a glass-fibre filter in the bottom, spiked with a known amount of surrogate standard for quantitation purposes and left overnight at 4 °C. Hydromatrix bulk sorbent (Varian, Palo Alto, CA, USA) was used to fill up void volumes.

The PLE procedure was performed with three extraction cycles using methanol (100 %) as extraction solvent. The extraction pressure was set at 1,500 psi and the extraction temperature was 50 °C. The rest of the conditions were: heat time, 2 min; static time, 5 min; flush volume 60 %; and purge time, 60 s.

The extracts were concentrated under a gentle stream of N₂ in a Turbo Vap LV evaporator (Zymark, Hopkinton, MA, USA) and then dried in a Pierce-Reacti-Vap III evaporator (Rockford, IL, USA). Final reconstitution of the extracts was done with 1 mL of methanol.

LC-MS/MS analysis Chromatographic separation of the target EDCs was carried out with a Purospher STAR RP-18 end-capped column (125×2.0 mm; particle size, 5 µm) preceded by a guard column (4×4 mm, 5 µm) of the same packing material (Merck). The flow rate was 0.2 mL/min, and the injection volume was 10 µL.

Phthalate esters were detected in the positive ionisation mode (PI) with the electrospray (ESI) interface using a mobile phase consisting of A (water with 0.1 % of acetic acid as a modifier) and B (methanol). The proportion of B increased from 40 to 90 % in the first four minutes and to 100 % B in the following 2 min; this percentage was maintained during 20 min and then returned to its initial conditions in 5 min.

Alkylphenols, bisphenol A and estrogens were simultaneously determined in the negative ionisation (NI) mode with

the ESI interface using a mobile phase consisting of a 35-min gradient with water (A) and acetonitrile (B): initially, 30 % B increased to 85 % B in 8 min and then to 100 % B in the following 12 min; this proportion was kept constant during 10 min and readjusted to initial condition in 5 min.

Other important parameters are the source and probe temperatures which were set at 450 and 150 °C, respectively, for the analysis in NI mode, and at 350 and 80 °C, respectively, for analysis in the PI mode. The corona discharge was maintained at −3 kV in both cases.

Selected reaction monitoring (SRM) was chosen as acquisition mode due to its sensitivity and selectivity. Two SRM transitions (four identification points) were recorded for the identification and confirmation of each target compound, according to de European Decision Commission 2002/657/EC. The ratio of the two SRM transitions was used as a criterion of identification of the compounds to avoid false positive results and overestimations.

Instrument control and data acquisition and evaluation were performed with MassLynx 4.0 software (Waters).

Blank problems considerations Blank contamination is a notorious problem in the determination of alkylphenols, bisphenol A and phthalate esters at ultratrace levels [11, 13]. Detergents and plastic material should be avoided and special care in all steps of the experimental procedure should be taken into account.

Blank analysis revealed the presence of NP, DEP, DBP and DEHP. Instrumental and procedural blanks were frequently checked and kept under control. Procedural blanks were analysed in triplicate and the contribution of these compounds was subtracted from the samples to avoid overestimations in the results.

Results and discussion

Optimisation of the LC-MS/MS method The relevant instrument conditions for the spectrometric determination of the target compounds are shown in Table 1.

Although an efficient chromatographic separation is not crucial in MS/MS analysis, it can be still important in LC-MS/MS to avoid or minimise matrix effects.

In the optimisation of the LC-MS/MS conditions for analysis of the target EDCs different mobile phases based on acetonitrile/water and methanol/water with and without modifiers were tested. In the case of phthalates, gradient methanol/water acidified with 0.1 % acetic acid provided the best MS/MS responses in the PI mode. In the case of alkylphenols and bisphenol A, higher responses were obtained with methanol as organic solvent in the mobile phase whereas the best results for estrogens were obtained with acetonitrile. To reach a compromise, and considering the higher estrogenic potency

Table 1 SRM conditions for the LC-MS/MS analysis of EDCs in atmospheric particulate matter extracts

Compound	Ionisation mode	Retention time (min)	Precursor (<i>m/z</i>)	Product ion (<i>m/z</i>)	Cone (V)	Collision energy (eV)	SRM ratio
Compounds analysed in negative ionisation mode							
E1	NI	9.65±0.02	269 (M-H ⁻)	145, 143	50	40, 45	3.52±0.19
E1-d ₄	NI	9.62±0.02	273 (M-H ⁻)	147	50	40	–
E2	NI	8.93±0.02	271 (M-H ⁻)	145, 183	50	45, 45	1.05±0.1
E2-d ₅	NI	8.87±0.01	276 (M-H ⁻)	147	50	45	–
E3	NI	4.32±0.03	287 (M-H ⁻)	145, 171	50	40	1.07±0.03
E3-d ₃	NI	4.27±0.02	290 (M-H ⁻)	173	50	40	–
EE2	NI	9.35±0.02	295 (M-H ⁻)	145, 159	50	40	2.12±0.2
DES	NI	9.82±0.03	267 (M-H ⁻)	222, 237	30	35, 50	5.21±2.76
EE2-d ₄	NI	9.31±0.03	299 (M-H ⁻)	147	50	40	–
BPA	NI	8.69±0.02	227 (M-H ⁻)	212, 133	35	15, 25	1.85±0.09
BPA-d ₁₆	NI	8.66±0.02	241 (M-H ⁻)	138, 215	35	20, 25	–
tOP	NI	12.79±0.02	205 (M-H ⁻)	133, 116	35	25	8.9±0.3
tOP-d ₂	NI	12.77±0.09	207 (M-H ⁻)	135	35	25	–
4nNP	NI	16.36±0.04	219 (M-H ⁻)	106, 119	35	20	22.4±0.4
NP	NI	14.24±0.04	219 (M-H ⁻)	133, 147	40	25	9.97±0.56
4nNP-d ₈	NI	16.21±0.07	227 (M-H ⁻)	112	35	15	–
Compounds analysed in positive ionisation mode							
DMP	PI	8.10±0.03	195 (M-H ⁺)	163, 133	5	10, 25	3.75±0.14
DMP-d ₄	PI	8.13±0.007	199 (M-H ⁺)	167	10	15, 25	–
DEP	PI	9.56±0.02	223 (M-H ⁺)	149, 177	5	20, 10	1.51±0.03
DEP-d ₄	PI	9.53±0.01	227 (M-H ⁺)	153	5	20, 10	–
DBP	PI	11.63±0.05	279 (M-H ⁺)	149, 205	5	15, 5	3.11±0.39
DBP-d ₄	PI	11.64±0.01	283 (M-H ⁺)	153	10	15, 5	–
DEHP	PI	15.33±0.04	391 (M-H ⁺)	149, 167	10	20, 15	8.44±0.70
DEHP-d ₄	PI	15.28±0.04	395 (M-H ⁺)	153	10	20, 15	–

and hence the need to go further down in the limits of detection achieved for estrogens, gradient acetonitrile/water was finally chosen for the analysis of the EDCs measured in the NI mode, and three acquisition time windows were programmed (0–4, 4–11, and 11–35 min) to improve the sensitivity as much as possible. In this case (NI mode), modification of the mobile phase with bases or buffers was not further tested because it is known that these modifiers can induce ion suppression in the analysis of alkylphenols and bisphenol A [14] as well as estrogens [15].

Figure S2 (Electronic supplementary material) shows total ion current chromatograms obtained from the analysis of a standard mixture of the analytes in methanol at a concentration of 250 ng/mL.

Optimisation of the PLE procedure In the optimisation of the PLE procedure, the main parameters that affect the extraction, such as extraction solvent, pressure, temperature and number of extraction cycles, were considered. Temperature was fixed at 50 °C to avoid the degradation of alkylphenols [16] and pressure is at 1,500 psi. Furthermore, the amount of sample analysed and a solid phase extraction (SPE) clean-up step

were also studied to improve the results and reduce possible matrix effects.

The first optimisation experiments were carried out with blank filters, divided in two equal portions and spiked with 250 ng of the target compounds. After PLE, the extracts obtained were dried under a stream of nitrogen and reconstituted with 1 mL of a standard mixture of the deuterated compounds in methanol at a concentration of 250 ng mL⁻¹.

At first, filters were extracted sequentially with the following series of decreasing polarity solvents and solvent mixtures (*n*=3): methanol, methanol/acetone (50:50, *v/v*), acetone, dichloromethane/methanol (70:30, *v/v*), hexane/acetone (50:50, *v/v*), dichloromethane and hexane. All the analytes were extracted in the first three steps (absolute recoveries (AR) of >60 %), except DEHP, which was mainly extracted in the dichloromethane:methanol (70:30, *v/v*) fraction because of its apolar properties. In light of these results, the first four solvents were considered in the following studies, whereas the more apolar solvents were discarded to avoid matrix interferences and improve analytical recoveries.

The optimisation of the number of extraction cycles (*n*=3) was carried out in a second set of experiments. Filters were

extracted with three cycles of the solvents previously chosen. The extracts of the first two cycles were collected in the same vial and the third extract in an independent vial. The best results (absolute recoveries of >60 %) for alkylphenols and some steroid sex hormones were obtained with three cycles of methanol; the best results for the other compounds were obtained with three cycles of methanol/acetone (50:50, v/v).

To select the optimal solvent, considering also the influence of matrix interferences in the results, air sampling filters were extracted in the same way as above, i.e., using three cycles of methanol and in parallel 3 cycles of methanol/acetone (50:50, v/v) as extraction solvents.

Figure 1 shows the recoveries (absolute and relative) obtained for the target compounds with each extraction solvent. Recoveries were similar for all compounds, except DEP and especially DBP, which were suitably extracted only with methanol. Furthermore, lower standard deviations (RSD < 25 % for all compounds) were obtained with this solvent. For these reasons, methanol (100 %) was chosen as an extraction solvent.

However, as Fig. 1 shows, AR decreased sharply when the above-described PLE procedure was applied to real samples. To improve the results and reduce the matrix effects, a new set of experiments was carried out. The amount of sample was varied to search for the best possible compromise between sensitivity and matrix effects and a clean-up step based on SPE was introduced in the analytical protocol after the PLE step.

Portions of 1/2, 1/4 and 1/8 filter were extracted according to the described procedure. The same experiments were repeated but applying a SPE step after PLE with the help of a Baker LSE 12G apparatus (J.T. Baker, Deventer, Netherlands) connected to a vacuum system set at -15 psi. PLE extracts were evaporated to approximately 1 mL under a nitrogen stream, redissolved in 100 mL of HPLC grade water, and passed through 3-mL cartridge columns packed with 500 mg of LiChrolut C18 sorbent from Merck (Darmstadt, Germany). The cartridges were previously activated and conditioned first with 7 mL of methanol and then with 3 mL of HPLC water at a

flow rate of 1 mL/min. The sample extracts were loaded at a flow rate of 5 mL/min and subsequently eluted with 2 × 4 mL of methanol, following previously published methods optimised for the analysis of the same compounds in sediments [17, 18]. The eluates were evaporated to dryness with a gentle stream of nitrogen and reconstituted with methanol to a final volume of 1 mL. Figure 2 shows the AR obtained for all analytes and deuterated surrogate standards in this set of experiments. The best results were obtained when 1/8 filter was analysed: AR above 40 % with lower deviations (RSD < 20 %) for all compounds.

No improvement in recoveries was observed when the SPE clean-up was applied. Furthermore, high blanks of DEP and DBP were observed due to contamination by the SPE cartridge. Consequently, the SPE clean-up was discarded thereby reducing the number of steps and the analysis time, as well as blank contamination problems.

Method performance Quantitation of the compounds, based on peak areas, was performed using the deuterated analogues of the target analytes (and in the absence of them other compounds with similar structure) as surrogate standards. The performance of the method was evaluated in terms of the linearity, sensitivity, repeatability, recovery, and matrix effects. The results obtained are shown in Table 2.

The linearity of the method was evaluated between 0.01 and 1,000 ng/mL using an 11-point calibration curve. The response was linear between the method quantitation limit (MQL) and 500 ng/mL (equivalent to 50 ng/m³) with coefficients of determination (r^2) higher than 0.9976 for all compounds.

The method limits of detection and MQL were experimentally estimated from the analysis of sampled filters as the real concentration of analyte that gives a signal-to-noise ratio of 3 and 8, respectively. Because the limits of detection and quantitation vary from sample to sample (in connection to matrix effects) various real samples were investigated and the limits were expressed as their average. These values ranged from 2 to 83 pg/m³.

Fig. 1 Absolute recoveries (AR) and relative recoveries (RR) obtained using methanol and methanol/acetone (50:50, v/v) as extraction solvent

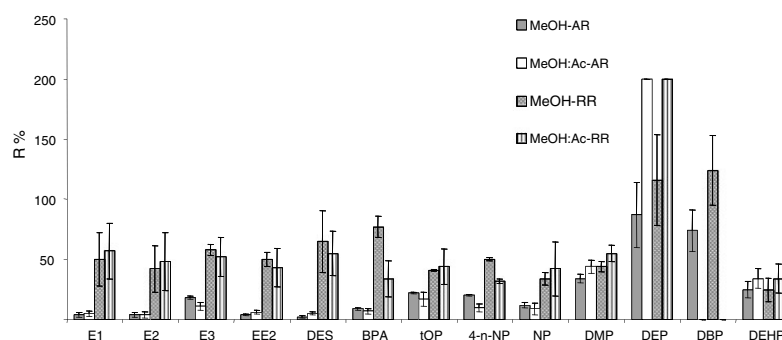
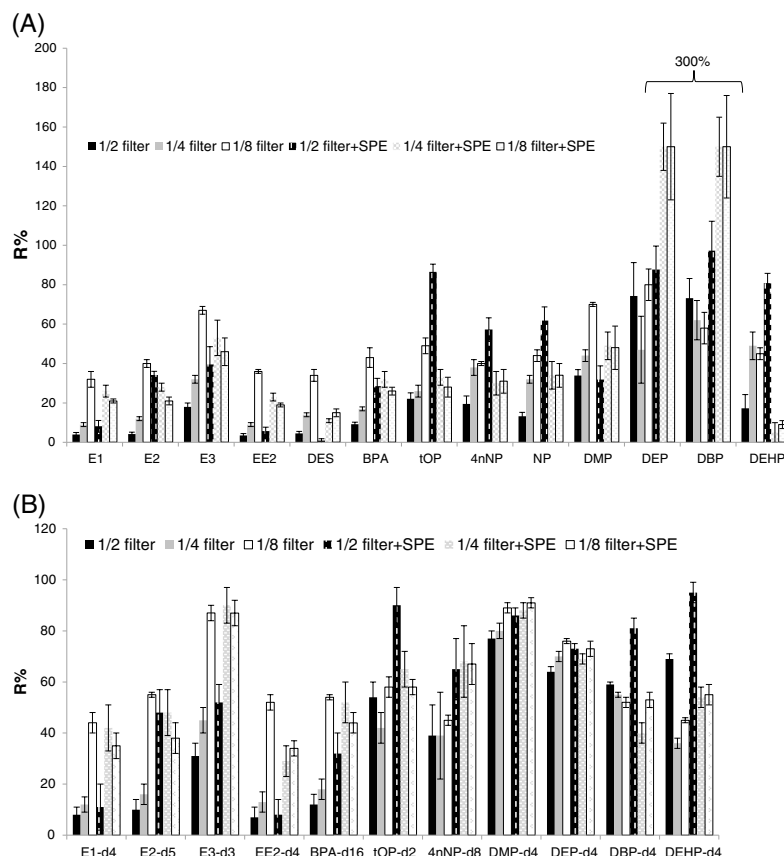


Fig. 2 Study of amount of sample and efficiency of SPE clean-up: absolute recoveries (*R*%) of (A) the target compounds (B) the deuterated surrogate standards



According to the European Decision 2002/657/EC [19], the accuracy and precision of the method were determined at two different concentrations (1 and 0.2 ng/m³). These concentrations were chosen taking as reference the allowable limit established for benzo(a)pyrene by Directive 2004/107/EC (1 ng/m³). The method repeatability was calculated as the within-day relative standard deviation (RSD) of six replicates of spiked sampling filters (100 and 20 ng) analysed by the same analyst with the same equipment and within a single day. The obtained RSD values were <15 % for all the target analytes.

AR were calculated as a percentage between the peak areas obtained for each analyte in the analysis of spiked sampling filters (100 and 20 ng) and the peak areas obtained when the equivalent amount of standards in methanol was directly injected (10 µL) in the LC-MS/MS. As it was previously explained, the presence of DEP, DBP, DEHP and NP in the procedural blanks was taken into account and its contribution was subtracted from the spiked samples. Relative recoveries (RR) were determined as a percentage between the AR of each

compound with respect to the AR of the corresponding surrogate. As it can be seen in Table 2, AR ranged between 34 and 71 % for all compounds, except for some estrogens (E1, E2 and EE2) which presented lower recoveries (<30 %) because of matrix effects. However, RR were satisfactory (100±20 %) because of the similarity behaviour between the compounds and the deuterated analogues throughout the analytical procedure.

In comparison with other published methods, this methodology allows the determination of the target analytes at ultratrace levels (MQL<83 pg/m³) analysing a small amount of sample (1/8 air sampling filter). Other advantages of the method are automation, minimum sample manipulation, simplicity of the experimental procedure avoiding the clean-up step, and short analysis time per sample (around 1.5 h).

Matrix effects The low AR (<40 %) obtained in some cases can be attributed to coeluting matrix compounds, which commonly produce signal enhancement or suppression in ESI. To

Table 2 Quality control parameters of the analytical method: linear determination coefficients (r^2), limits of detection (MDL) and quantitation (MQL), repeatability (RSD, in per cent), absolute recoveries (AR) and relative recoveries (RR) in air-sampling filters

Compounds	Linearity ^a (r^2)	MDL (pg/m ³)	MQL (pg/m ³)	Conc 100 ng/m ³			Conc 20 ng/m ³		
				RSD ^b	AR ^c	RR ^d	RSD ^b	AR ^c	RR ^d
E1	0.9976	4	11	15	25	92	2	22	117
E1-d ₄					26			19	
E2	0.9991	15	39	10	18	87	3	23	110
E2-d ₅					21			21	
E3	0.9986	7	18	5	59	99	2	47	92
E3-d ₃					60			53	
EE2	0.9988	31	83	7	16	80	7	26	92
DES	0.9987	7	18	10	22	97	3	26	109
EE2-d ₄					21			22	
BPA	0.9989	12	32	12	34	113	3	28	115
BPA-d ₁₆					27			23	
tOP	0.9996	24	63	7	36	88	5	37	78
tOP-d ₂					44			44	
4nNP	0.9985	17	45	7	19	86	14	22	96
NP	0.9985	8	22	15	32	107	15	26	116
4nNP-d ₈					27			19	
DMP	0.9994	9	24	8	55	75	15	42	77
DMP-d ₄					73			55	
DEP	0.9980	2	5	9	65	111	3	63	115
DEP-d ₄					58			55	
DBP	0.9980	7	20	14	71	121	15	77	99
DBP-d ₄					61			52	
DEHP	0.9997	10	26	10	46	93	11	46	88
DEHP-d ₄					53			60	

^a Calibration range: MQL - 500 ng/mL (equivalent to 50 ng/m³)^b Relative standard deviation ($n=6$; in per cent)^c Average recovery of the investigated analytes after extraction of spiked air sampling filters^d Relative to the associated labelled surrogate standard

evaluate this phenomenon, the relation between peak signals and concentrations in various diluted/concentrated extracts was studied.

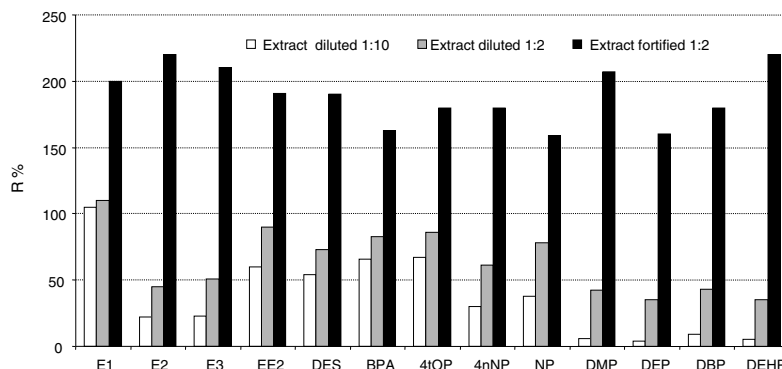
Half sampling filters were spiked (250 ng) and extracted following the described procedure. Three 100 μ L aliquots of a reconstituted extract were diluted 1:10, diluted 1:2, and evaporated to dryness and reconstituted with 100 μ L of a standard mixture of the analytes at 500 ng/mL (obtaining concentrations of 25, 125 and 525 ng/mL, respectively) and compared with the same extract without dilution/concentration. In the absence of matrix effects, the peak areas obtained would correspond to 10, 50 and 200 % of the peak areas observed in the original extract. However, peak signals higher than expected in the diluted extracts and lower than expected in the concentrated extracts suggest the existence of matrix ionisation suppression effects whereas the opposite findings point at the existence of matrix ionisation enhancement effects. As it can be seen in Fig. 3,

phthalates were little affected by matrix effects, whereas the other compounds suffered ionisation suppression/enhancement effects. These results clearly show the importance of using deuterated surrogate standards for quantification, especially in the case of the compounds measured in the NI mode, to compensate for matrix effects and their variability between samples.

Levels of EDCs in Airborne particles The validated method was applied to the analysis of eight air sampling filters collected in three areas of A Coruña: a non-polluted suburban area, an urban area, and an industrial area. Table 3 shows the concentrations found in each sample. As an example, the SRM chromatograms corresponding to one positive real sample are shown in Fig. S3 (Electronic supplementary material).

The identification of the compounds was carried out according to the European legislation 2002/657/EC [19].

Fig. 3 Evaluation of matrix effects. Relative signals obtained after dilution 1:10 and 1:2 and fortification 1:2 of a spiked (250 ng) sample extract



Thus, the retention time ($\pm 2\%$) and the SRM ratio of the target compounds ($\pm 20\text{--}50\%$) in the sample were compared with those of standards analysed in the same LC-MS/MS conditions.

Overall, the levels of EDCs monitored increased in the order urban area < suburban area < industrial area. This fact was expected because these compounds can be associated with industrial applications like plastic manufacture (DEHP and DBP represent 50 % of the phthalate esters plasticisers) [6]. By chemical class, phthalates were the most ubiquitous and abundant compounds, followed by alkylphenols, bisphenol A and estrogens.

Of all five estrogens analysed, only two, namely, E1 and E2, were detected, in one sample (I_1) from the industrial area, at levels below the corresponding limits of quantitation. The other estrogens, E3, EE2 and DES, with vapour pressure values below 1.41×10^{-8} mmHg, were not detected in any sample.

BPA, with a low-vapour pressure also of 8.7×10^{-8} mmHg, was only determined in one urban sample at a level of 108 pg/m^3 . This compound was previously analysed inside an electronic factory and determined at a level of 8 ng/m^3 [10].

As regards alkylphenols, the linear isomer of nonylphenol (4nNP) was not detected in any sample. This compound is not used in industrial processes, so it is scarcely found in the environment. Octylphenol (tOP) was detected in all samples but in all of them at concentrations below the MQL. Nonylphenol (NP), found also in all samples, was together with the phthalates DMP, DBP and DEHP, among the most ubiquitous and abundant compounds. Concentrations of NP ranged between 252 and 760 pg/m^3 . These values are one order of magnitude lower than the values reported in an urban-industrial area near the River Hudson Estuary (6.1 ng/m^3) [20] and higher than a concentration reported in Germany (0.040 ng/m^3) [7].

Table 3 Concentrations (in picograms per cubic meter) of EDCs in the air sampling filters analysed

Compound	PM _{2.5} (pg/m ³)							
	Suburban area		Urban area				Industrial area	
	S ₁	S ₂	U ₁	U ₂	U ₃	U ₄	I ₁	I ₂
E1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<MQL	n.d.
E2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<MQL	n.d.
E3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
EE2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
DES	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
BPA	<MQL	<MQL	108	n.d.	n.d.	<MQL	n.d.	n.d.
tOP	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL
4nNP	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
NP	252	516	473	321	422	760	501	420
DMP	<MQL	26.8	<MQL	168	250	404	265	221
DEP	3,336	1,183	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,497	2,177
DBP	1,057	35,307	258	10,196	664	866	6,967	54,676
DEHP	780	558	1,259	375	579	1,067	639	555

n.d. not detected, <MQL below limit of quantitation

Within the group of phthalates, the most abundant compound was DBP, followed by DEP, DEHP and DMP. DMP and DEHP were detected in all samples: DMP at levels lower than 404 pg/m³ and DEHP at levels between 375 and 1,259 pg/m³. DEP was only found in suburban and industrial samples, at concentrations ranging between 1,183 and 3,336 pg/m³. These values are comparable to those reported in other studies which are in the range of 0.005–1.03 ng/m³ in APM [7]. Finally, the highest concentrations corresponded to DBP which reached levels as high as 54,676 pg/m³ in the industrial area. This value is more than ten times higher than others reported in the literature [6].

Daily exposure to EDCs via air Daily exposure to the target analytes via air was evaluated with the objective to estimate potential endocrine disrupting effects on health of the inhabitants of A Coruña.

Firstly, the estrogenic activity of the air of A Coruña associated to the measured analytes was estimated in terms of estradiol equivalent (EEQ_i) concentrations by applying the estradiol equivalent factors (EEFs) listed in Table 4 and the following equations:

$$EEQ_i = C_i \times EEF_i \text{ and } EEQ_t = \sum EEQ_i$$

where *i* refers to the compound *i* with concentration *C* and EEQ_{*t*} is the total EEQ concentration. These equations were applied to the three investigated areas and the total EEQ were compared. For the calculations, the estrogenic potential of each sample within the same area was averaged. Table 4 shows also the contribution of each compound to the total estrogenicity activity calculated in each area.

The determined EEQ values were similar in the three areas but the highest concentration was observed in the urban area (0.48 pg/m³). The compound that contributed the most to the

total estrogenic potential of the air was NP. Due to its comparatively higher estrogenic activity (EEF 9E–004), NP accounted for more than 90 % of the total EEQ values in all investigated areas whereas phthalate esters contributed <1 %. Where bisphenol A was present (urban area), it was the second most relevant compound in terms of estrogenic activity.

Conversely, to evaluate the potential consequences of the exposure to these EDCs, the inhalation rates estimated by the US EPA [21] for toddlers (6.8 m³/day) and adults (11 m³/day) were considered. The estimated levels of exposure by air inhalation expressed in EEQ were around 3 pg/day for toddlers and 5 pg/day for adults.

Finally, the obtained results were compared with the acceptable daily intake (ADI) of E2 to evaluate the possible damage to human health. This value was established in reference to the no-observed-adverse-effect-level concentration set by the Food and Agricultural Organisation between 0 and 3.5 µg/day (assuming an adult median weight of 70 kg) [22]. The obtained results were six orders of magnitude lower than the established ADI value. Hence, contamination of the air of A Coruña by these compounds is not expected to have consequences on the health of its inhabitants in terms of estrogenic effects even though exposure to these EDCs via ingestion of food, dust and water and skin contact, can add up and has to be taken into account. Health problems associated to exposure to EDCs include the development of non-descended testes in young males, breast cancer in women, prostate cancer in men, developmental effects on the nervous system in children, attention deficit/hyperactivity in children and thyroid cancer [23].

Conclusions

In this work, an analytical methodology for the simultaneous determination of 13 EDCs (including for the first time steroid sex hormones and synthetic estrogens) in APM was

Table 4 Estrogenic activity of the APM measured in different areas of A Coruña

Compound	EEF	Suburban area		Urban area		Industrial area	
		EEQ _i	Contribution (%)	EEQ _i	Contribution (%)	EEQ _i	Contribution (%)
BPA	6E–004 ^a	–	–	0.03	7	–	–
NP	9E–004 ^a	0.34	98	0.44	92	0.41	98
DMP	1E–006 ^b	1.5E–005	0.004	2E–004	0.04	2E–004	0.06
DEP	5E–007 ^b	1.1E–003	0.32	–	–	9E–004	0.2
DBP	1E–007 ^b	1.8E–003	0.52	3E–004	0.06	3E–003	0.7
DEHP	1E–006 ^b	6.6E–004	0.19	8.2E–004	0.17	6E–004	0.14
EEQ _t (pg/m ³)		0.349		0.481		0.419	

Estradiol equivalent factor (EEF), estradiol equivalent concentration (EEQ) and contribution of each compound to the estrogenic activity (in per cent)

^a Zhang et al. [24]

^b Liu et al. [25]

developed and validated. The method is based on PLE of the sampling quartz microfiber filters and subsequent analysis of the extracts by LC-MS/MS. An additional clean-up step based on SPE was tested as a means to reduce matrix effects, but it was discarded to avoid increasing blank contamination problems and analysis time, labour and cost.

With the proposed method, satisfactory repeatability and accuracy, as well as low limits of detection and quantitation were obtained using a small amount of sample (1/8 air filter). Furthermore, the PLE-LC-MS/MS methodology developed could be a useful tool also for the analysis of these compounds in other solid matrices with any or few modifications.

The application of the method to the analysis of several samples collected in three different areas of A Coruña evidenced the ubiquity of NP, DBP and DEHP in the air. The presence of some steroid sex hormones (E1 and E2) was also evidenced but in only one sample and at below quantitation levels. No previous works about the analysis of steroid sex hormones and/or synthetic estrogens such as EE2 and DES in APM were found in the literature; therefore, more studies are needed to get a deeper knowledge on the potential occurrence and effects of estrogens on human health through this via (plus others) because of their elevated estrogenic potency.

The estrogenic activity associated to the compounds measured in the APM samples collected in the different areas of A Coruña was also estimated, and NP was found to be the main contributor to the calculated activity. In addition, the daily exposure to these EDCs via inhalation was evaluated for adults and toddlers considering the corresponding inhalation rates, but the results do not presuppose risks to human health.

Further studies are needed to evaluate the outdoor spatial distribution of these compounds as well as their occurrence in indoor air to investigate the exposition and possible effects on human health in daily life.

Acknowledgements This work has been supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness projects (Ref CGL2010-18145 and Consolider-Ingenio 2010 CSD2009-00065), the Xunta de Galicia project (Ref 10MDS164019PR), the 'Program of Consolidation and structuring of competitive research groups in the University system of Galicia' (Ref 52/2010) and the Generalitat de Catalunya (Consolidated Research Group, Water and Soil Quality Unit 2009-SGR-965). The authors would like to thank the University Institute of Environment of A Coruña (IUMA) for the supply of the samples and M. Piñeiro for her technical support. N. Salgueiro acknowledges Xunta de Galicia and Campus do Mar International Campus of Excellence for the Ph.D. grant. Merck is acknowledged for the gift of LC columns and SPE cartridges.

References

- Iwai K, Mizuno S, Miyasaka Y, Mori T (2005) Correlation between suspended particles in the environmental air and causes of disease among inhabitants: cross-sectional studies using the vital statistics and air pollution data in Japan. *Environ Res* 99(1):106–117
- Moreda-Pineiro J, Moscoso-Perez C, Pineiro-Iglesias M, Lopez-Mahia P, Muniategui-Lorenzo S, Fernandez-Fernandez E, Prada-Rodriguez D (2007) As, Bi, Sb and Sn determination in atmospheric particulate matter by direct solid sampling-hydride generation-electrothermal atomic absorption spectrometry. *Talanta* 71(5):1834–1841
- Petrovic M, Eljarrat E, López de Alda MJ, Barceló D (2001) Analysis and environmental levels of endocrine-disrupting compounds in freshwater sediments. *TrAC-Trends Anal Chem* 20(11):637–648
- Rudel RA, Camann DE, Spengler JD, Kom LR, Brody JG (2003) Phthalates, alkylphenols, pesticides, polybrominated diphenyl ethers, and other endocrine-disrupting compounds in indoor air and dust. *Environ Sci Technol* 37(20):4543–4553
- Xie Z, Lakaschus S, Ebinghaus R, Caba A, Ruck W (2006) Atmospheric concentrations and air sea exchanges of nonylphenol, tertiary octylphenol and nonylphenol monoethoxylate in the North Sea. *Environ Pollut* 142(1):170–180
- Salapaidou M, Samara C, Voutsas D (2011) Endocrine disrupting compounds in the atmosphere of the urban area of Thessaloniki, Greece. *Atmos Environ* 45(22):3720–3729
- Xie Z, Selzer J, Ebinghaus R, Caba A, Ruck W (2006) Development and validation of a method for the determination of trace alkylphenols and phthalates in the atmosphere. *Anal Chim Acta* 565(2):198–207
- Fu P, Kawamura K (2010) Ubiquity of bisphenol A in the atmosphere. *Environ Pollut* 158(10):3138–3143
- Berkner S, Streck G, Herrmann R (2004) Development and validation of a method for determination of trace levels of alkylphenols and bisphenol A in atmospheric samples. *Chemosphere* 54(4):575–584
- Sabatini L, Barbieri A, Violante FS (2005) Development and validation of a capillary high-performance liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometric method for the quantification of bisphenol A in air samples. *Rapid Commun Mass Sp* 19(23):3468–3472
- Salgueiro-González N, Concha-Graña E, Turnes-Carou I, Muniategui-Lorenzo S, López-Mahia P, Prada-Rodriguez D (2012) Determination of alkylphenols and bisphenol A in seawater samples by dispersive liquid-liquid microextraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry for compliance with Environmental Quality Standards (Directive 2008/105/EC). *J Chromatogr A* 1223: 1–8
- European Standard EN12341 (1998). Air quality—determination of the PM10 fraction of suspended particulate matter—reference method and field test procedure to demonstrate reference equivalent of measurement methods
- Fankhauser-Noti A, Grob K (2007) Blank problems in trace analysis of diethylhexyl and dibutyl phthalate: investigation of the sources, tips and tricks. *Anal Chim Acta* 582(2):353–360
- Gallart-Ayala H, Moyano E, Galceran MT (2010) On-line solid phase extraction fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of bisphenol A and its chlorinated derivatives in water samples. *J Chromatogr A* 1217(21):3511–3518
- de Alda MJL, Diaz-Cruz S, Petrovic M, Barceló D (2003) Liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry of selected emerging pollutants (steroid sex hormones, drugs and alkylphenolic surfactants) in the aquatic environment. *J Chromatogr A* 1000(1–2):503–526. doi:10.1016/S0021-9673(03)00509-0
- Petrovic M, Lacorte S, Viana P, Barceló D (2002) Pressurized liquid extraction followed by liquid chromatography-mass spectrometry for the determination of alkylphenolic compounds in river sediment. *J Chromatogr A* 959(1–2):15
- de Alda MJL, Gil A, Paz E, Barceló D (2002) Occurrence and analysis of estrogens and progestogens in river sediments by liquid chromatography-electrospray-mass spectrometry. *Analyst* 127(10): 1299–1304. doi:10.1039/b207658f

18. Petrovic M, Sole M, de Alda MJL, Barcelo D (2002) Endocrine disruptors in sewage treatment plants, receiving river waters, and sediments: Integration of chemical analysis and biological effects on feral carp. *Environ Toxicol Chem* 21(10):2146–2156
19. Commission Decision 2002/657/EC (2002) Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results
20. Dachs J, Van Ry DA, Eisenreich SJ (1999) Occurrence of estrogenic nonylphenols in the urban and coastal atmosphere of the lower Hudson River estuary. *Environ Sci Technol* 33(15):2676–2679
21. EPA (1997). Exposure Factors Handbook
22. JECFA (2000) Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food. WHO Food Additives Series, no. 43. Cambridge University Press, Cambridge
23. WHO (2012) http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2013/hormone_disrupting_20130219/en/index.html
24. Zhang X, Gao Y, Li Q, Li G, Guo Q, Yan C (2011) Estrogenic Compounds and estrogenicity in surface water, sediments, and organisms from Yundang Lagoon in Xiamen, China. *Arch Environ Contam Toxicol* 61(1):93
25. Liu C, Zhao B, Zhang Y (2010) The influence of aerosol dynamics on indoor exposure to airborne DEHP. *Atmos Environ* 44(16):1952–1959

ANEXO X

Analysis and occurrence of endocrine-disrupting chemicals in
airborne particles

TrAC, Trends in Anal Chem, 66 (2015) 45-52



Contents lists available at ScienceDirect

Trends in Analytical Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/trac

Analysis and occurrence of endocrine-disrupting chemicals in airborne particles



N. Salgueiro-González ^a, M.J. López de Alda ^{b,*}, S. Muniategui-Lorenzo ^a,
D. Prada-Rodríguez ^a, Damià Barceló ^{b,c}

^a Applied Analytical Chemistry Research Group (QANAP), University Institute of Research in Environmental Studies, Department of Analytical Chemistry, University of A Coruña, Campus da Zapateira, Rua da Fraga 10, E-15008 A Coruña, Spain

^b Water and Soil Quality Research Group, Department of Environmental Chemistry, Institute of Environmental Assessment & Water Research (IDAEA-CSIC), Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona, Spain

^c Catalan Institute for Water Research (ICRA), Universitat de Girona, Emili Grahit, 101, Edifici H2O, Parc Científic i Tecnològic, 17003 Girona, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Airborne particle
Alkylphenol
Analysis
Bisphenol A
Dibutyl phthalate
Diethyl phthalate
Endocrine-disrupting chemical
Phthalate
Sex hormone
Synthetic sex hormone

ABSTRACT

This article presents an overview of the analytical methods for the determination of target endocrine-disrupting chemicals (EDCs) in airborne particles. Among EDCs, we selected four important groups of compounds (alkylphenols, bisphenol A, phthalates, and natural and synthetic sex hormones) because of their worldwide production, environmental ubiquity and toxicity. Due to their physical and chemical properties (high molecular weight, low/medium polarity and volatility), these EDCs can be present in the atmosphere mainly associated with particulate matter. EDCs linked to small particles (PM₁₀ and PM_{2.5}) can penetrate into the respiratory system and damage human health. We discuss aspects of analytical methodology, such as sampling, extraction, and determination. We review levels found in outdoor and indoor samples. According to the results reported, human exposure to these compounds, especially in indoor environments, should be investigated in more depth, since some compounds, such as dibutyl phthalate and diethyl phthalate, reach levels of µg/m³.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	46
2. Specific groups of endocrine-disrupting chemicals	46
2.1. Natural and synthetic sex hormones	46
2.2. Alkylphenols	47
2.3. Bisphenol A	47
2.4. Phthalates	47
3. Analysis of endocrine-disrupting chemicals in samples of airborne particles	47
3.1. Sampling	49
3.1.1. Outdoor air	49
3.1.2. Indoor air	49
3.2. Sample handling	49
3.3. Separation and determination	49
4. Levels of endocrine-disrupting chemicals in airborne particles	49
4.1. Outdoor air	50
4.2. Indoor air	50
5. Conclusions	51
Acknowledgments	51
References	51

* Corresponding author. Tel.: +34 93 400 61 34; Fax: +34 93 204 59 04.
E-mail address: miaqam@cid.csic.es (M.J. López de Alda).

1. Introduction

Endocrine-disrupting chemicals (EDCs) can affect the balance of the endocrine system in humans and animals. Some naturally occurring compounds can interfere with hormone biosynthesis, metabolism or action, resulting in deviation from normal homeostatic control or reproduction [1]. Furthermore, numerous synthetic chemicals used in industrial, agricultural and household applications have endocrine-disrupting properties.

In the past 50 years, the presence of EDCs in the environment has increased due to the growth of population and industrial and technological advances. In 1999, the European Union established the “Community Strategy for Endocrine Disruptors”, which includes more than 680 substances able to damage the hormone system [2]. Research to date has mainly focused on disrupting compounds that can have negative effects in human reproduction – acting on estrogen receptors ER α and ER β – such as the four groups considered in this work [i.e. alkylphenols (APs), bisphenol A (BPA), phthalates, and natural and synthetic sex hormones] [3].

EDCs are introduced into the aquatic environment by urban and sewage-treatment plant (STP) discharges and tend to accumulate in sediments and biota due to their hydrophobic character. Furthermore, EDCs can bioconcentrate along the food chain, damaging human health. The occurrence of EDCs in aquatic environments and biological samples has been widely reported [4–9].

Meanwhile, humans are exposed to EDCs via ingestion, inhalation and dermal pathways. Consequently, different sources of these compounds should be considered in order to ensure public safety. High levels of endocrine-disrupting pollutants were measured in food (mainly in fatty food) because of the environmental pollution and migration by contact with plastics and other materials used in processing and storage of foodstuffs [10,11]. Moreover, their presence in personal-care products, such as hair sprays, nail polishes, solvents and perfume fixatives, has also been demonstrated [12,13].

Another potential pathway of exposure to EDCs is environmental air; however, few studies about this topic can be found in the literature. The atmosphere is a geochemical reservoir of organic compounds, interacting with oceans, land and living organisms, including human beings [14]. Partitioning between gas phase and airborne particles is also common. The fraction associated with airborne particles increases with higher values of molecular weights (MWs) and lower values of vapor pressure [15]. As a result, EDCs can be inhaled, penetrate into the respiratory system and be deposited in the lungs, where they are adsorbed to inhalable atmospheric particles PM₁₀ (coarse particles, less than 10 μ m in diameter) or PM_{2.5} (fine particles, less than 2.5 μ m in diameter).

Significant correlation of particulate matter (PM) with mortality has been demonstrated in different studies of respiratory diseases [16]. Recently, the International Agency for Research on Cancer (IARC) and the World Health Organization (WHO) announced that there is convincing evidence that exposure to outdoor air pollution causes lung cancer, and it has been classified as carcinogenic to humans (Group 1). PM, a major component of outdoor air pollution, was evaluated separately and also classified as carcinogenic to humans (Group 1) [17].

The damage to human health increases in closed places due to poor ventilation and slow chemical-degradation processes [18]. People spend about 90% of time in cars, houses and offices, so indoor air requires greater attention [19]. The measured concentrations of EDCs in indoor air are higher than those in outdoor air because of the use of plasticizers and other compounds, such as polybrominated diphenyl ethers (used as flame retardants) in the production of buildings and furniture [19,20]. As a result, indoor air is one of the most serious environmental risks to public health that also needs to be taken into account [21].

Although exposure to EDCs via air can occur outdoors and indoors, specific knowledge concerning potential human health effects of these EDCs is still limited. These EDC pollutants could act additively or have antagonistic or other interactive effects by operating at different points in cell-signaling systems [21]. Because exposure to mixtures is critical in health effects, simultaneous multi-class investigations of different EDCs are required.

2. Specific groups of endocrine-disrupting chemicals

This review focuses on four classes of semi-volatile EDCs with similar disrupting properties. Table 1 shows their physical and chemical properties and estrogenic activity.

Vapor-pressure values (between 10^{−13} mmHg and 1 mmHg) indicate that these compounds can volatilize and be present in the atmosphere [25]. In addition, their octanol-water partition coefficients (K_{ow}) show their tendency to be associated with PM.

2.1. Natural and synthetic sex hormones

Natural and synthetic sex hormones have been widely used in daily life and in the livestock industry for various purposes, such as contraception, human and veterinary therapy, and growth promotion [15]. They include biogenic hormones, such as 17 β -estradiol (E2) and their metabolites estrone (E1) and estriol (E3), and synthetic chemicals such as 17 α -ethynylestradiol (EE2), used mainly as a contraceptive, and diethylstilbestrol (DES).

Table 1
Physicochemical properties and estradiol equivalent factors of target endocrine-disrupting chemicals

Compound	Molecular weight	Log K _{ow}	Vapor pressure (mm Hg)	Henry's law constant (atm m ³ /mole)	EEF
Estrone	270.37	3.13 ^a	1.42E-007 ^a	3.8E-010 ^a	0.01–0.20 ^c
17- β -Estradiol	272.39	4.01 ^a	1.26E-008 ^a	3.7E-011 ^a	1 ^c
Estriol	288.39	2.45 ^a	1.97E-010 ^a	1.3E-012 ^a	0.46 ^c
17- α -Ethinyl estradiol	296.41	3.67 ^a	2.67E-009 ^a	7.9E-012 ^a	1.25 ^c
Diethylstilbestrol	268.36	5.07 ^a	1.41E-008 ^a	5.8E-012 ^a	1.25–8 ^c
4-tert-octylphenol	206.33	4.12 ^b	3.6E-004 ^b	4.5E-006 ^b	1E-005–8E-004 ^c
Nonylphenol	220.34	4.48 ^b	9.5E-005 ^b	5.9E-006 ^b	2.3E-005–9E-004 ^c
Bisphenol A	228.29	3.40 ^b	8.7E-010 ^b	9.8E-011 ^b	2.3E-005–6E-004 ^c
Dimethyl phthalate	194.20	1.61 ^b	1.7E-003 ^b	9.5E-008 ^b	1E-006 ^d
Diethyl phthalate	222.20	2.54 ^b	4.8E-005 ^b	2.4E-007 ^b	5E-007 ^d
Dibutyl phthalate	278.35	4.27 ^b	7.3E-005 ^b	1.3E-006 ^b	1E-007 ^d
Diethylhexyl phthalate	390.56	7.73 ^b	9.8E-008 ^b	3.9E-005 ^b	1E-006 ^d

EEF, Estradiol equivalent factor; Log K_{ow}, Octanol-water partition coefficient.

^a [22].

^b [23].

^c [7].

^d [24].

Sex hormones are the most important EDCs in terms of estrogenic potency because they can cause adverse effects on the reproduction system at low levels (ng L^{-1}) [26]. Decrease of fertility, feminization and hermaphroditism of aquatic organisms are attributed to estrogens [27]. These compounds metabolize to sulfate and glucuronide conjugates that are then eliminated in urine. Although the conjugated estrogens do not exhibit biological activity, they are converted back into the free forms in wastewater-treatment plants (WWTPs) [28].

These pollutants have been widely analyzed in the aquatic environment [29]. E2 and EE2 are, together with diclofenac, included in the so-called watch list of contaminants that deserve special attention according to EU Directive 2013/39/EU (amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy).

Sorption to PM and sediments has also been demonstrated, especially of synthetic sex hormones [7]. However, the occurrence of sex hormones in air has scarcely been investigated [30]. Although the vapor-pressure values of these compounds indicate that they are non-volatile, sorption to airborne particles can occur. Furthermore, estrogenic activity has already been demonstrated by immunoassays for low β -estradiol concentrations in particulate air [31]. For all these reasons and in order to protect human health, the fate and the occurrence of estrogens in the air should be examined. For this task, it is essential to develop sensitive and selective analytical methods.

2.2. Alkylphenols

AP polyethoxylates (APEOs) – especially octylphenol (OP) and nonylphenol (NP) polyethoxylates – are non-ionic surfactants that have been widely used since the 1970s in many applications, such as detergents, industrial liquid soaps, cosmetics, paints, and dispersant agents in pesticides and herbicides [32].

APs are the anaerobic breakdown products of APEOs produced during biological wastewater-treatment processes. Although degradation of APEOs is the main source of nonyl phenol (NP) and 4-tert-octylphenol (tOP), direct discharge of these compounds into the environment due to the production of plastic products should be taken into account. NP is used in the manufacture of tris(nonylphenyl)phosphate (TNPP), an antioxidant agent of high-density polyethylene (HDPE), poly(ethylene terephthalate) (PET), and poly(vinyl chloride) (PVC) [33].

APEOs are not classified as highly toxic substances, but APs disrupted the endocrine systems of animals and humans in *in-vivo* and *in-vitro* assays [34]. Some effects in humans are decreased sperm counts, reproductive disorders and breast cancer [1].

Due to their volatilization in STPs and their direct industrial emission, APs can be found in the atmosphere. Air studies suggest that volatilization should be considered a mechanism of distribution when the environmental fate of NP is investigated, especially in warm seasons [35]. However, the partitioning of NP and its transport in the atmosphere are not clear so they should be further investigated.

2.3. Bisphenol A

BPA is widely used in the production of polycarbonate, epoxy resins, flame retardants and many other products. It is discharged into the environment from chemical-reaction processes and depolymerization. Other sources of BPA are combustion of computer printed circuit boards in electronic waste and spraying of paint [14]. This compound can bind to the estrogen receptor inducing estrogen-dependent gene expression in different types of cells, including those derived from breast cancer tissue [36].

In spite of its water solubility and low volatility, few air studies are reported. BPA is not likely to occur in the gas phase; however,

it can be associated with particles, especially with dust in indoor air [37]. Although estrogenic activity has been demonstrated in BPA-containing airborne particles [36], no data about particle-bound degradation has been found in the literature and therefore more studies about the behavior and distribution of this compound in air are required.

2.4. Phthalates

Phthalate-acid esters are commonly used as plastic additives. Higher MW phthalates, such as dibutyl phthalate (DBP) and di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), are components of polymeric materials, such as cellulose esters and vinyl chloride copolymers (PVC). Consequently, many consumer products contain these compounds, including building materials, household furnishings, medical devices, children's toys or food packaging [38]. Furthermore, lower MW phthalate esters, such as dimethyl phthalate (DMP) and diethyl phthalate (DEP), are used as solvents in personal-care products (perfumes, nail polish, liquid soaps and moisturizers) [20].

These compounds are discharged into the environment directly from the plastics-material production and indirectly via volatile emission. Risk assessment on phthalates indicates low toxicity. However, their estrogenic activity has been demonstrated in *in vivo* and *in vitro* assays [38].

The presence of phthalates in air samples has been described in the literature. Because they are not chemically bound to PVC, they can also migrate, leach or evaporate into indoor air and the atmosphere [13]. Laboratory and field studies show that partitioning of phthalates in aerosols increases as K_{ow} increases and vapor pressure decreases; in this way, DEHP tends to be associated to particulates, especially to dust in indoor air [15]. Correlations between the presence of phthalates in environmental air and in human urine have also been found [21]. Consequently, more research is necessary in order to protect human health, especially in indoor environments.

3. Analysis of endocrine-disrupting chemicals in samples of airborne particles

The analysis of EDCs in airborne particles has been scarce in comparison with their analysis in other environmental samples. Although there are no established concentration limits in European Directives related to the monitoring of these compounds in air, it has been probed that low concentrations of these compounds can cause damage in human health; consequently, sensitive, efficient and accurate analytical methodologies are necessary.

In 2008 Xie et al. (2008) [39] published an overview of the analytical methods described for the determination of EDCs in air samples between 2002 and 2008. However, this overview was focused on the analysis of the vapor phase; the analysis of airborne particles was only barely commented. In the same year, Weschler et al. (2008) [25] also reviewed the occurrence and the sources of some EDCs in indoor environment. However, the analysis of EDCs in airborne particles has not been addressed in detail in any previously published review work.

Table 2 compiles different analytical methodologies published for the determination of EDCs in airborne particles from outdoor and indoor environments, with indication of the target compounds, the type of particles (PM_{10} , $\text{PM}_{2.5}$ or dust) analyzed, the sampling strategy employed, and the experimental conditions used for extraction and detection. Regardless of the analytical methodology employed, blank contamination problems should be taken into account in the analysis of some EDCs, such as 4-tOP, NP and DEHP, in order to avoid overestimations in the results [33]. Concentrations

Table 2
Methodologies described for analysis of semi-volatile endocrine-disrupting chemicals in airborne particles

Compounds of interest	Type of particles	Sampling	Sample preparation technique	Clean up	Separation and detection	Ref.
<i>Outdoor air</i>						
BPA	NM	Glass fiber filters (13 mm diameter)	Sonication: MeOH	–	HPLC-ED	[40]
NP	NM	High Volume Sampler	Soxhlet: DCM	Elution 15 mL DCM:MeOH (1:2)	CC-MS-EI	[41]
		Flow rate 0.5 m ³ min ⁻¹				
NP, tOP, OP	NM	Quartz fiber filters (47 mm diameter)	Sonication: 10 mL acetone	–	CC-MS-EI	[42]
		Flow rate 10 L min ⁻¹			Derivatization: BSTFA	
BPA, NP, tOP	NM	Glass gas traps	Sonication: 80/50/50 mL of hexane/acetone (1:1)	Silica (3 g)	CC-MS-EI	[43]
		Glass fiber filters (150 mm diameter)		Elution 70 mL hexane/ethyl acetate 9:1 v/v (NP, tOP) and 40 mL hexane:ethyl acetate 3:7 (BPA)	Derivatization: BSTFA + TMSCl	
BPA	NM	Flow rate 60 m ³ h ⁻¹	Sonication: 300 mL benzene/methanol (3:1)	–	CC-MS-EI	[36]
		High volume sampler			Derivatization: BSTFA	
BPA	NM	Flow rate 1900 m ³ 24 h ⁻¹	Sonication: 3 mL DCM + H ₂ SO ₄ (9N)	–	LC-ESI-MS/MS	[44]
		Personal air-sampling pump			H ₂ O (0.01% acetic acid)/ACN	
NP, tOP	NM	Flow rate 4 L min ⁻¹	Soxhlet: 150 mL DCM	5% H ₂ O deactivated silica gel (2.5 g)	CC-MS-EI	[35,45]
		High volume sampler		Elution 30 mL hexane/diethyl ether (3:1 v/v)	Derivatization: BSTFA + TMSCl	
BPA	PM ₁₀ , PM _{2.5}	Flow rate 0.2 m ³ min ⁻¹	Sonication: DCM/MeOH (2:1 v/v)	–	CC-MS-EI	[14]
		Quartz fiber filters			Derivatization: BSTFA + TMSCl + pyridine	
BPA, BzBP, DBP, DEP, DEHP, DMP, NP, tOP	PM ₁₀	Flow rate 1200 L min ⁻¹	Sonication: 3 cycles of DCM	5% H ₂ O deactivated silica gel (3 g) + Na ₂ SO ₄ (1 g)	CC-MS-EI	[23]
		High volume (PM ₁₀) and medium volume (PM _{2.5}) samplers		Elution hexane/diethyl ether (3:1 v/v) + hexane:diethyl ether (1:3 v/v)	Derivatization: BSTFA (BPA, NP, tOP)	
NP, OP (linear isomers)	NM	Prototype for atmospheric sampling	PLE: Hexane/DCM/isopropanol (40:30:30); 80°C; 580 psi	–	LC-ESI-MS/MS	[46]
DBP, DEP, DEHP, DMP	PM _{2.5}	High volume sampler	PLE: Methanol (100%); 50°C; 1500 psi	–	H ₂ O (1 mM NH ₄ AC)/MeOH	[30]
BPA, DES, E1, E2, E3, EE2, NP, tOP		Flow rate 30 m ³ h ⁻¹			LC-ESI(-)-MS/MS	
		Quartz microfiber filters			H ₂ O/ACN	
<i>Indoor air</i>						
BzBP, DBP, DBP, DEP, DEHP	Dust	Cellulose thimble	Soxhlet: 6% Diethyl ether/hexane, 16 h	Florisil column	CC-MS-EI	[21]
				Elution 20 mL acetone/hexane (10:90)	Derivatization: BSTFA	
NP, tOP			Sonication: 3 × 18 mL DCM + 1 mL H ₂ SO ₄ :H ₂ O (1:1)	–	CC-MS-EI	[42]
NP, tOP, OP	NM	SPE Disk C18	Sonication: 10 mL acetone	–	Derivatization: BSTFA	
BPA, NP, tOP	NM	Flow rate 10 mL min ⁻¹			LC-ESI-MS	[37]
		Glass filter (47 mm) + SPE Disk C18	Elution with 30 mL MeOH	–	H ₂ O (0.01% acetic acid)/ACN	[47,48]
BzBP, DBP, DBP, DEP, DEHP, DMP	NM	Flow rate 7 L min ⁻¹	Elution 5 mL with acetone	–	GC-MS/MS-PCI (isobutane reagent gas)	
		SPE aminopropyl silica cartridges				
BzBP, DBP, DBP, DEP, DEHP	Dust	Flow rate: 1 L min ⁻¹	Sonication: 2 × 15 mL 6% Diethyl ether/hexane	–	CC-MS-EI	[49]
		Dust filters				

Abbreviations: ACN, Acetonitrile; BPA, Bisphenol A; BzBP, Benzylbutyl phthalate; BSTFA, N,O-bis-trimethylsilyl trifluoroacetamide; DBP, Di-iso-butyl-phthalate; DMP, Di-methyl-phthalate; DES, Dichloromethane; DEP, Di-ethyl-phthalate; DEHP, Di-(2-ethylhexyl)-phthalate; DMP, Di-methyl-phthalate; E1, Estrone; E2, 17 β -Estradiol; E3, Estradiol; ED, Electrochemical detection; EE2, 17 α -Ethinylestradiol; EI, Electron ionization; ESI, Electrospray ionization; GC, Gas chromatography; HPLC, High-performance liquid chromatography; LC, Liquid chromatography; MeOH, Methanol; MS, Mass spectrometry; NM, Not mentioned; NP, Nonylphenol; OP, 4-n-Octylphenol; PLE, Pressurized liquid extraction; TMSCl, Trimethylsilyl chloride; tOP, 4-tert-Octylphenol.

up to 64 (4-top), 120 (NP) and 2972 (DEHP) ng/m³ have been detected in laboratory air [45].

3.1. Sampling

3.1.1. Outdoor air

Atmospheric samples were usually collected using high-volume dust samplers [14,30,36,45] or glass gas traps [43,44,46]. Quartz-fiber filters were the most frequently used filters to separate airborne particles and vapor phase. Before sampling, filters were pre-heated [at 290°C overnight [43], 400°C for 3 h [42] and 12 h [30], or 450°C during 6 h [14,23,45]] in order to eliminate organic matter, and they were then weighed after 48-h conditioning in a desiccator at constant temperature (20 ± 1°C) and relative humidity (50 ± 5%) [23,30]. In general, aspiration volumes of 0.2–60 m³ h⁻¹ for 24 h were chosen in order to obtain a representative sample. After sampling and until further analysis, filters were stored in a freezer (–20°C).

Environmental air pollution had been commonly monitored using PM₁₀ samples [14,23], though smaller particle sizes, such as PM_{2.5}, have also been used [14,30]. However, growing importance is given to ultrafine particles (particles less than 0.1 µm in diameter), which can be absorbed directly from alveolar walls. The behavior and the occurrence of EDCs in these ultrafine particles require additional research.

3.1.2. Indoor air

Different apparatuses were employed for sampling indoor environments. Indoor air was collected using solid-phase extraction (SPE) cartridges [37,42] or, more often, quartz-fiber filters [21,49], alone or in combination with SPE disks. In all cases, filters were fixed in the surface of possible sources of pollutants. Manual air pumps with low aspiration volumes (<50 m³·h) were usually employed. After sampling, filters and disks were stored in the dark at –4°C [20].

3.2. Sample handling

In order to isolate EDCs from the airborne particulate and to achieve the low limits of detection (LODs) required, efficient sample preparation to remove possible interferences and to preconcentrate the analytes is necessary.

Different extraction techniques, such as Soxhlet extraction [21,35,41,45], sonication [14,21,23,40,42–44,49] and pressurized liquid extraction (PLE) [30,46], were employed. Dichloromethane, hexane and other toxic solvents were generally used as extractants.

However, new methods should be developed in accordance with the principles of Green Analytical Chemistry [50]. Berkner et al. [43] compared the three techniques above for the analysis of APs and BPA using a mixture of hexane:acetone (1:1) as extractant solvent. Unexpectedly, lower recoveries were obtained with PLE due to the loss of analytes in the lines of the equipment. However, satisfactory results were achieved for all the compounds considered in the present review, when extracted by PLE using methanol as solvent [30].

A clean-up step was added to the process in some cases, due to the amount of interfering compounds present in the extracts. For this purpose, SPE using silica [23,35,43,45], alumina [41] or Florisil [21] was generally employed.

3.3. Separation and determination

In the first methods developed, BPA was determined in airborne-particle extracts by high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled to electrochemical detection (ED) [40]. However, this methodology had high LODs and lacked specificity and robustness. For these reasons, gas chromatography (GC) and LC coupled to mass

spectrometry (MS) or tandem MS (MS/MS) are commonly used for identification and quantification of semi-volatile EDCs.

GC-MS is a valuable tool in the multi-residue analysis of semi-volatile EDCs [21]. For the ionization of the target compounds, electron ionization (EI) was employed in almost all cases. This technique fragments phthalates, leading to a highly characteristic ion at *m/z* 149 (except for DMP at *m/z* 163), which corresponds to the protonated phthalic anhydride [48]. Bergh et al. [47] compared two ionization techniques for the analysis of phthalates (i.e. EI coupled to GC-MS and chemical ionization (CI) coupled to GC-MS/MS). The best results were obtained with positive-ion CI when using isobutane as reagent because of the effective noise reduction and the high selectivity provided by the MS/MS analysis.

Meanwhile, a derivatization step is frequently required when APs and BPA (high-molecular-weight, non-volatile compounds) are analyzed by GC-MS in order to obtain adequate chromatographic peaks and resolution [51]. For this purpose, silylation with *N*-O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) has been most commonly used as the derivatization reaction (see Table 2). However, some authors avoid this step to simplify the experimental process and to prevent losses of analytes [52].

When technical NP (more than 211 isomers) is analyzed by GC-MS, there is a group of isomers obtained because of the high resolution of this technique. However, individual quantitation of the isomeric compounds is complicated due to the lack of individual standards. In contrast, when technical NP is analyzed by reversed phase LC-MS, where separation occurs in line with the character of the hydrophobic moiety, only one peak is obtained, thereby increasing the peak intensity and hence the sensitivity of the determination [53]. For this reason, analysis of APs by LC-MS is very common.

In contrast to GC-MS, LC-MS determines all target EDCs without a derivatization step. In addition, LC-MS is usually the most appropriate technique for analysis of high-MW compounds, such as those reviewed here, due to its superior performance in terms of ionization efficiency and sensitivity. However, few works have so far reported use of this technique for the analysis of EDCs in airborne particles [30,37,44,46]. The analysis of BPA, APs and sex hormones by LC-MS has been performed using electrospray ionization (ESI) in negative mode, whereas phthalates are measured in positive mode [30]. In either case, a modifier agent is usually added to the mobile phase in order to improve the ionization of the compounds (see Table 2).

4. Levels of endocrine-disrupting chemicals in airborne particles

In recent decades, many research efforts were dedicated to gaining more knowledge about the occurrence and the impact of EDCs in the environment. However, whereas data for the aquatic environment is abundant in the scientific literature, information on the fate and the occurrence of EDCs in air is scant.

Rudel et al. [19] reported concentration levels for different EDCs in outdoor and indoor air, but sex hormones were not included in their study. There is only one work on the occurrence of natural and synthetic estrogens in air in the literature [30]. According to the physico-chemical properties of these compounds, volatilization of estrogens from water is not expected to be a dominant process. However, sorption of estrogens to airborne particles can take place, as previously demonstrated by Salgueiro-González et al. [30], who detected low concentrations of these compounds (E1 and E2) in the atmosphere. Consequently, estrogens should be included in further air studies to improve assessment of human exposure to EDCs in air and thus protect human health.

Table 3 shows the concentrations of EDCs in outdoor and indoor airborne particles previously reported in the literature (indicating

Table 3
Concentrations of endocrine-disrupting chemicals in outdoor and indoor air

Sampling location	Compounds analyzed	Compounds not detected	Detected concentrations (ng/m ³)	Ref.
<i>Outdoor air</i>				
Urban, industrial and coastal area	NP	–	0.1–51	[41]
Rural area	BPA, NP, tOP	BPA	0.0017–0.117 (NP); 0.0003–0.004 (tOP)	[43]
Urban area	NP, tOP	–	bLOD – 30.5 (NP); bLOD – 5.3 (tOP)	[42]
Urban area	BPA	–	0.02–1.92	[36]
Industrial area	BPA	–	6.7–13.9	[44]
Urban area	BzBP, DiBP, DBP, DEP, DEHP, DMP, NP, tOP	–	0.7–1.37 (BzBP); 0.32–6.85 (DiBP); bLOD–3.75 (DBP); bLOD–0.23 (DEP); 0.02–0.06 (DEHP); bLOD–0.011 (DMP); 0.005–0.12 (NP); bLOD–0.017 (tOP)	[45]
Urban area, rural area, marine region and polar region	BPA	–	0.001–17.4	[14]
Urban area	BPA, BzBP, DBP, DEP, DEHP, DMP, NP, tOP	DEP, DMP	0.06–18.6 (BPA); 0.04–0.98 (BzBP); 0.43–2.4 (DBP); 4.63–45 (DEHP); 1.6–16.5 (NP); 0.01–0.12 (tOP)	[23]
Urban area	NP, OP (linear isomers)	NP, OP	–	[46]
Urban, rural and suburban area	BPA, DBP, DEP, DEHP, DES, DMP, E1, E2, E3, EE2, NP, tOP	DES, E3, EE2, tOP	bLOD–0.108 (BPA); 0.258–54.67 (DBP); bLOD–3.336 (DEP); 0.375–1.259 (DEHP); bLOD–0.404 (DMP); bLOQ (E1); bLOQ (E2), 0.252–0.76 (NP)	[30]
<i>Indoor air</i>				
Houses	BzBP, DiBP, DBP, DEP, DEHP, NP, tOP	tOP	bLOD – 480 (BzBP); 61–990 (DiBP); 220–1100 (DBP); 590–4300 (DEP); 77–1000 (DEHP); 110–420 (NP)	[21]
Houses and day care center	BzBP, DiBP, DBP, DEP, DEHP	–	In µg/g dust: 4.2–16.2 (BzBP); 16.6–18.1 (DiBP); 8.1–30 (DnBP); 1.9–3.1 (DEP); 220–540 (DEHP)	[49]
Houses and offices	NP, tOP	–	bLOD – 680 (NP); bLOD–53.1 (tOP)	[42]
Houses and offices	BPA, NP, tOP	–	bLOD – 3.6 (BPA); 3.3 – 184 (NP); bLOD – 48.5 (tOP)	[37]
Houses	BzBP, DiBP, DBP, DEP, DEHP, DMP	–	3.2–110 (BzBP); 86–460 (DiBP); 80–760 (DBP); bLOD–410 (DEP); 223–520 (DEHP); 5.4–30 (DMP)	[47]
Houses, day care center, offices	BzBP, DiBP, DBP, DEP, DEHP, DMP	–	6.6–97 (BzBP); 46–950 (DiBP); 190–2300 (DBP); 420–3900 (DEP); 15–530 (DEHP); 2.3–47 (DMP)	[48]

Abbreviations: bLOD, Below limit of detection; bLOQ, Below limit of quantification; BPA, Bisphenol A; BzBP, Benzylbutyl phthalate; DiBP, Di-iso-butyl-phthalate; DBP, Di-butyl-phthalate; DES, Di-ethyl-stilbestrol; DEP, Di-ethyl-phthalate; DEHP, Di-(2-ethylhexyl)-phthalate; DMP, Di-methyl-phthalate; E1, Estrone; E2, 17 β -estradiol; E3, Estriol; EE2, 17 α -Ethinylestradiol; NP, Nonylphenol; tOP, 4-tert-octylphenol.

the different types of area sampled) and we discuss them in the following sub-sections.

4.1. Outdoor air

EDCs can be found in air in the vapor phase or associated with airborne particles. In the case of APs, most of the studies performed indicated that these compounds are present in the atmosphere associated with airborne particles [23,41–43,46]. However, a few studies indicated that these compounds were present mainly in the vapor phase [54], with particle-associated fractions of 5% (tOP) and 15% (NP) [45]. Linear isomers were not detected in the atmosphere (presumably because they are hardly used in industrial applications) [46] whereas branched isomers were detected in almost all samples. NP has been found in outdoor air more frequently and at higher levels than tOP because NP is widely used in industrial processes [30,43]. Higher concentrations of these compounds have been measured in urban sites near to WWTPs because of water-air exchange processes [23,41]. According to these researchers, APs are ubiquitous contaminants in the atmosphere, so they should be investigated in more depth in order to get deeper knowledge about their occurrence and their distribution in this compartment.

BPA was also found in outdoor air samples in association with the core of airborne particles [36]. Emissions from uncontrolled fires of household wastes, electronic equipment or cables are considered possible sources of BPA [23]. BPA was measured with positive results in an electronic industry factory using epoxy resins at high temperature [44]. The spatial and temporal distribution of BPA in the atmosphere was also investigated by Fu et al. [14]. Urban and rural sites, the marine environment and the Polar region were studied. The highest concentrations were found, as expected, in urban sites, and were attributed to open burning of plastics in domestic waste [14]. However, in the Polar region, BPA was still measured

as a result of long-distance transport, so there is a clear need to study further the environmental distribution of BPA.

Within the group of phthalates, the more volatile compounds, such as BzBP and DEP, were found in the vapor phase at comparatively higher concentrations than the heavier compounds (e.g. DBP and DEHP), which were more prevalent in airborne particles and dust [21]. Concentrations of phthalate esters measured in urban and suburban areas were higher than in rural areas because of point sources (such as industrial sites and vehicular emissions) and environmental recycling [23,30].

However, although DEHP is the most important phthalate used in industry, DBP was measured at higher concentrations, probably because of its longer half-life in the atmosphere and its comparatively higher vapor pressure (7.3E-5 versus 9.8E-8) [21]. Consequently, DEHP should also be included in further environmental studies and environmental risk evaluations [45].

4.2. Indoor air

As can be seen in Table 3, higher frequencies of detection and several orders of magnitude higher concentrations of EDCs have been found in indoor air than in the outdoor environment. These findings might be explained by the wide use of many of these compounds in the plastics manufacture [19] and the poor ventilation and slow chemical degradation processes taking place indoors [37]. Flooring, PVC covering of the walls, and building furniture were the main sources of EDCs in indoor air, according to Wechler et al. in their overview of the variations of indoor pollutants since 1950 [25].

Indoor air samples were usually collected in houses, offices and day-care centers, where children and adults spend more time [42]. Rudel et al. [21] investigated the presence of the target EDCs in indoor air from houses. In this study, phthalates (especially DEHP) and NP were detected in 100% of the samples, while tOP and BPA were mea-

sured in more than half, which indicates the importance of monitoring these compounds in indoor environments. Also, some of the phthalates (DBP and DEP) were found at $\mu\text{g}/\text{m}^3$ levels.

Meanwhile, Saito et al. [42] analyzed the occurrence of APs in houses and offices. In general, concentrations in homes were often higher than in offices. Although more plastics furniture can be present in offices, the ventilation systems that operate during work hours reduce the contamination levels. Another possible reason, especially in cold areas or seasons, is that windows at home may be opened little. Studies showed a correlation between the levels of some EDCs in indoor air with room temperature and the age of building construction [42].

Langer et al. [49] measured phthalates in houses and day-care centers. DEHP was the most abundant phthalate, with concentrations 1–10 times greater than those of the other phthalates. The levels of concentration of DnBP, BBzP and DEHP in care centers were higher than in houses, which are attributed to the presence of more plastics sources. However, the concentration of DEP was higher in houses because of its presence in personal-care products. Similar results were obtained by Bergh et al. [48], who investigated the levels of phthalate esters in houses, offices and day-care centers.

In the light of these results, and considering that people spend a lot of time indoors, more studies in this line of research are needed to protect human health.

5. Conclusions

We demonstrated the presence of estrogenic EDCs in the atmosphere in different studies. In outdoor air, the highest concentrations were observed for NP (30 ng/m^3), DEHP (45 ng/m^3) and DBP (55 ng/m^3). Industrial sites appear to be more contaminated than urban and less inhabited areas. In indoor air, the concentrations are much higher, reaching values in the $\mu\text{g}/\text{m}^3$ range. The most abundant EDCs in enclosed areas are DBP and DEP, with levels up to 2300 ng/m^3 and 4300 ng/m^3 , respectively. BPA was found in outdoor and indoor areas but at considerably lower concentrations (<20 ng/m^3). As regards estrogens, only the two natural hormones, E2 and E1, were detected, at levels below the method quantification limits in outdoor air.

Thus, besides water and diet, air pollution is an important source of EDCs, which could affect human health by inhalation. To prevent environmental hazards and health problems, more air-quality studies in relation to this kind of compounds should be performed. Monitoring studies designed to investigate temporal and spatial distributions would be necessary in order to characterize the source, the transport and the fate of EDCs in the atmospheric compartment. Also, special attention should be paid to indoor areas where people spend a lot of time and where some EDCs have been found at considerably high concentrations, as a result, among other factors, of low degradation and poor ventilation.

Research would also be needed to evaluate the presence and the impact of other EDCs in the air, including the combined effect of various estrogenic compounds. Finally, in order to accomplish the objectives above, it would be desirable to develop advanced multi-residue analytical methods.

Acknowledgments

This work has been supported by the Spanish Ministry of Science and Technology projects (Ref CGL2010-18145 and Consolider-Ingenio 2010 CSD2009-00065), the Xunta de Galicia project (Ref 10MDS164019PR), the “Program of Consolidation and Structuring of Units of Competitive Investigation of the University System of Galicia (Xunta de Galicia)” (Ref GRC2013-047), and the Generalitat de Catalunya (Consolidated Research Groups “2014 SGR 418–Water and Soil Quality Unit” and “2014 SGR 291–ICRA”). N. Salgueiro

acknowledges Xunta de Galicia and Campus do Mar, International Campus of Excellence, for the Ph.D. grant.

References

- [1] E. Diamanti-Kandarakis, J.-P. Bourguignon, L.C. Giudice, R. Hauser, G.S. Prins, A.M. Soto, et al., Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement, *Endocr. Rev.* 30 (2009) 293–342.
- [2] EU, Community Strategy for Endocrine Disruptors – a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife, COM (1999)706, 1999.
- [3] B. Singh, A. Kumar, A.K. Malik, Recent advances in sample preparation methods for analysis of endocrine disruptors from various matrices, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 44 (2014) 255–269.
- [4] Y. Yu, L. Wu, A.C. Chang, Seasonal variation of endocrine disrupting compounds, pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment plants, *Sci. Total Environ.* 442 (2013) 310–316.
- [5] N. Salgueiro-González, I. Turnes-Carou, S. Muniategui-Lorenzo, P. Lopez-Mahia, D. Prada-Rodriguez, Fast and selective pressurized liquid extraction with simultaneous in cell clean up for the analysis of alkylphenols and bisphenol A in bivalve molluscs, *J. Chromatogr. A* 1270 (2012) 80–87.
- [6] R.L. Gomes, M.D. Scrimshaw, E. Cartmell, J.N. Lester, The fate of steroid estrogens: partitioning during wastewater treatment and onto river sediments, *Environ. Monit. Assess.* 175 (2011) 431–441.
- [7] X. Zhang, Y. Gao, Q. Li, G. Li, Q. Guo, C. Yan, Estrogenic compounds and estrogenicity in surface water, sediments, and organisms from Yundang Lagoon in Xiamen, China, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 61 (2011) 93–100.
- [8] G. Hamelin, G. Charest-Tardif, K. Krishnan, D.G. Cyr, M. Charbonneau, P.J. Devine, et al., Determination of p-tert-octyl phenol in blood and tissues by gas chromatography coupled with mass spectrometry, *J. Anal. Toxicol.* 32 (2008) 303–307.
- [9] L. Schmidt, J. Mueller, T. Goen, Simultaneous monitoring of seven phenolic metabolites of endocrine disrupting compounds (EDC) in human urine using gas chromatography with tandem mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 2019–2029.
- [10] D. Perez-Palacios, M.A. Fernandez-Recio, C. Moreta, M.T. Tena, Determination of bisphenol-type endocrine disrupting compounds in food-contact recycled-paper materials by focused ultrasonic solid-liquid extraction and ultra performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry, *Talanta* 99 (2012) 167–174.
- [11] N.A. Suci, F. Tiberto, S. Vasileiadis, L. Lamastra, M. Trevisan, Recycled paper-paperboard for food contact materials: contaminants suspected and migration into foods and food simulant, *Food Chem.* 141 (2013) 4146–4151.
- [12] M. Llopart, M. Celeiro, J. Pablo Lamas, L. Sanchez-Prado, M. Lores, C. Garcia-Jares, Analysis of plasticizers and synthetic musks in cosmetic and personal care products by matrix solid-phase dispersion gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1293 (2013) 10–19.
- [13] P. Gimeno, A.F. Maggio, C. Bousquet, A. Quioirez, C. Cívade, P.A. Bonnet, Analytical method for the identification and assay of 12 phthalates in cosmetic products: application of the ISO 12787 international standard “Cosmetics-Analytical methods-Validation criteria for analytical results using chromatographic techniques”, *J. Chromatogr. A* 1253 (2012) 144–153.
- [14] P. Fu, K. Kawamura, Ubiquity of bisphenol A in the atmosphere, *Environ. Pollut.* 158 (2010) 3138–3143.
- [15] C. Liu, B. Zhao, Y. Zhang, The influence of aerosol dynamics on indoor exposure to airborne DEHP, *Atmos. Environ.* 44 (2010) 1952–1959.
- [16] K. Iwai, S. Mizuno, Y. Miyasaka, T. Mori, Correlation between suspended particles in the environmental air and causes of disease among inhabitants: cross-sectional studies using the vital statistics and air pollution data in Japan, *Environ. Res.* 99 (2005) 106–117.
- [17] WHO, International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, IARC: Outdoor air pollution a leading environmental cause of cancer deaths, 2013.
- [18] D. Wenger, A.C. Gerecke, N.V. Heeb, P. Schmid, C. Hueglin, H. Naegeli, et al., In vitro estrogenicity of ambient particulate matter: contribution of hydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons, *J. Appl. Toxicol.* 29 (2009) 223–232.
- [19] R.A. Rudel, L.J. Perovich, Endocrine disrupting chemicals in indoor and outdoor air, *Atmos. Environ.* 43 (2009) 170–181.
- [20] R.A. Rudel, R.E. Dodson, L.J. Perovich, R. Morello-Frosch, D.E. Camann, M.M. Zuniga, et al., Semivolatile endocrine-disrupting compounds in paired indoor and outdoor air in two Northern California communities, *Environ. Sci. Technol.* 44 (2010) 6583–6590.
- [21] R.A. Rudel, D.E. Camann, J.D. Spengler, L.R. Korn, J.G. Brody, Phthalates, alkylphenols, pesticides, polybrominated diphenyl ethers, and other endocrine-disrupting compounds in indoor air and dust, *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003) 4543–4553.
- [22] M. Kuster, M.J. Lopez, M.J.L. de Alda, D. Barcelo, Analysis and distribution of estrogens and progestogens in sewage sludge, soils and sediments, *Trends Anal. Chem.* 23 (2004) 790–798.
- [23] M. Salapasidou, C. Samara, D. Voutsas, Endocrine disrupting compounds in the atmosphere of the urban area of Thessaloniki, Greece, *Atmos. Environ.* 45 (2011) 3720–3729.
- [24] P. de Voigt, B. van Hattum, Critical factors in exposure modeling of endocrine active substances, *Pure Appl. Chem.* 75 (2003) 1933–1948.

- [25] C.J. Weschler, W.W. Nazaroff, Semivolatile organic compounds in indoor environments, *Atmos. Environ.* 42 (2008) 9018–9040.
- [26] S. Liu, G.-G. Ying, J.-L. Zhao, F. Chen, B. Yang, L.-J. Zhou, et al., Trace analysis of 28 steroids in surface water, wastewater and sludge samples by rapid resolution liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 1367–1378.
- [27] V. Gabet-Giraud, C. Miegé, B. Herbreteau, G. Hernandez-Raquet, M. Coquery, Development and validation of an analytical method by LC-MS/MS for the quantification of estrogens in sewage sludge, *Anal. Bioanal. Chem.* 396 (2010) 1841–1851.
- [28] A.D. LaFleur, K.A. Schug, A review of separation methods for the determination of estrogens and plastics-derived estrogen mimics from aqueous systems, *Anal. Chim. Acta* 696 (2011) 6–26.
- [29] M. Petrovic, E. Eljarrat, M.J.L. de Alda, D. Barcelo, Endocrine disrupting compounds and other emerging contaminants in the environment: a survey on new monitoring strategies and occurrence data, *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (2004) 549–562.
- [30] N. Salgueiro-González, M. Lopez de Alda, S. Munategui-Lorenzo, D. Prada-Rodríguez, D. Barcelo, Determination of 13 estrogenic endocrine disrupting compounds in atmospheric particulate matter by pressurised liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 8913–8923.
- [31] J. Wang, P. Xie, Y. Xu, A. Ketttrup, K.-W. Schramm, Differing estrogen activities in the organic phase of air particulate matter collected during sunny and foggy weather in a Chinese city detected by a recombinant yeast bioassay, *Atmos. Environ.* 38 (2004) 6157–6166.
- [32] T. Vega-Morales, Z. Sosa-Ferrera, J.J. Santana-Rodríguez, Determination of alkyl phenol polyethoxylates, bisphenol-A, 17 α -ethynylestradiol and 17 β -estradiol and its metabolites in sewage samples by SPE and LC/MS/MS, *J. Hazard. Mater.* 183 (2010) 701–711.
- [33] N. Salgueiro-González, E. Concha-Graña, I. Turnes-Carou, S. Munategui-Lorenzo, P. Lopez-Mahia, D. Prada-Rodríguez, Blank and sample handling troubleshooting in ultratrace analysis of alkylphenols and bisphenol A by liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Talanta* 101 (2012) 413–419.
- [34] A. David, H. Fenet, E. Gomez, Alkylphenols in marine environments: distribution monitoring strategies and detection considerations, *Mar. Pollut. Bull.* 58 (2009) 953–960.
- [35] Z. Xie, S. Lakaschus, R. Ebinghaus, A. Caba, W. Ruck, Atmospheric concentrations and air sea exchanges of nonylphenol, tertiary octylphenol and nonylphenol monoethoxylate in the North Sea, *Environ. Pollut.* 142 (2006) 170–180.
- [36] H. Matsumoto, S. Adachi, Y. Suzuki, Bisphenol A in ambient air particulates responsible for the Proliferation of MCF-7 human breast cancer cells and its concentration changes over 6 months, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 48 (2005) 459–466.
- [37] K. Inoue, S. Yoshida, S. Nakayama, R. Ito, N. Okanouchi, H. Nakazawa, Development of stable isotope dilution quantification liquid chromatography mass spectrometry method for estimation of exposure levels of bisphenol A, 4-tert-octylphenol, 4-octylphenol, 4-nonylphenol, tetrabromobisphenol A, and pentachlorophenol in indoor air, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 51 (2006) 503.
- [38] U. Heudorf, V. Mersch-Sundermann, J. Angerer, Phthalates: toxicology and exposure, *Int. J. Hyg. Environ. Health* 210 (2007) 623–634.
- [39] Z. Xie, R. Ebinghaus, Analytical methods for the determination of emerging organic contaminants in the atmosphere, *Anal. Chim. Acta* 610 (2008) 156–178.
- [40] K. Peltonen, J. Pukkila, Determination of bisphenol A in air by high-performance liquid-chromatography with electrochemical detection, *J. Chromatogr.* 439 (1988) 375–380.
- [41] J. Dachs, D.A. Van Ry, S.J. Eisenreich, Occurrence of estrogenic nonylphenols in the urban and coastal atmosphere of the lower Hudson River Estuary, *Environ. Sci. Technol.* 33 (1999) 2676.
- [42] I. Saito, A. Onuki, H. Seto, Indoor air pollution by alkylphenols in Tokyo, *Indoor Air* 14 (2004) 325–332.
- [43] S. Berkner, G. Streck, R. Herrmann, Development and validation of a method for determination of trace levels of alkyl phenols and bisphenol A in atmospheric samples, *Chemosphere* 54 (2004) 575–584.
- [44] L. Sabatini, A. Barbieri, F.S. Violante, Development and validation of a capillary high-performance liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometric method for the quantification of bisphenol A in air samples, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19 (2005) 3468–3472.
- [45] Z. Xie, J. Selzer, R. Ebinghaus, A. Caba, W. Ruck, Development and validation of a method for the determination of trace alkylphenols and phthalates in the atmosphere, *Anal. Chim. Acta* 565 (2006) 198–207.
- [46] C. Becouze, L. Wiest, R. Baudot, J.-L. Bertrand-Krajewski, C. Cren-Olive, Optimisation of pressurised liquid extraction for the ultra-trace quantification of 20 priority substances from the European Water Framework Directive in atmospheric particles by GC-MS and LC-FLD-MS/MS, *Anal. Chim. Acta* 693 (2011) 47–53.
- [47] C. Bergh, R. Torgrip, C. Östman, Simultaneous selective detection of organophosphate and phthalate esters using gas chromatography with positive ion chemical ionization tandem mass spectrometry and its application to indoor air and dust, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 24 (2010) 2859–2867.
- [48] C. Bergh, R. Torgrip, G. Emenius, C. Östman, Organophosphate and phthalate esters in air and settled dust – a multi-location indoor study, *Indoor Air* 21 (2011) 67–76.
- [49] S. Langer, C.J. Weschler, A. Fischer, G. Beko, J. Toftum, G. Clausen, Phthalate and PAH concentrations in dust collected from Danish homes and daycare centers, *Atmos. Environ.* 44 (2010) 2294.
- [50] P.T. Anastas, J.C. Warner, *Green Chemistry: Theory and Practice*, 1998.
- [51] E. Martínez, O. Gans, H. Weber, S. Scharf, Analysis of nonylphenol polyethoxylates and their metabolites in water samples by high-performance liquid chromatography with electrospray mass spectrometry detection, *Water Sci. Technol.* 50 (2004) 157–163.
- [52] G. Gatidou, N.S. Thomaidis, A.S. Stasinakis, T.D. Lekkas, Simultaneous determination of the endocrine disrupting compounds nonylphenol, nonylphenol ethoxylates, triclosan and bisphenol A in wastewater and sewage sludge by gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1138 (2007) 32–41.
- [53] M.A.J. Lopez de Alda, S. Díaz-Cruz, M. Petrovic, D. Barceló, Liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry of selected emerging pollutants (steroid sex hormones, drugs and alkyl phenolic surfactants) in the aquatic environment, *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 503–526.
- [54] C.J. Weschler, T. Salthammer, H. Fromme, Partitioning of phthalates among the gas phase, airborne particles and settled dust in indoor environments, *Atmos. Environ.* 42 (2008) 1449.

ANEXO XI

Otras publicaciones



Contents lists available at ScienceDirect

Environmental Pollution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/envpol

Bioaccumulation of 4-nonylphenol and effects on biomarkers, acetylcholinesterase, glutathione-S-transferase and glutathione peroxidase, in *Mytilus galloprovincialis* mussel gills

Leticia Vidal-Liñán ^{a,*}, Juan Bellas ^b, Noelia Salgueiro-González ^c, Soledad Muniategui ^c, Ricardo Beiras ^d

^a Departamento de Ecología e Bioloxía Animal, Universidade de Vigo, Estrada Colexio Universitario s/n, 36310 Vigo, Galicia, Spain

^b Instituto Español de Oceanografía, Centro Oceanográfico de Vigo, Apdo.1552, 36280 Vigo, Galicia, Spain

^c Grupo Química Analítica Aplicada (QANAP), Instituto Universitario de Medio Ambiente (IUMA), Departamento de Química Analítica, Facultade de Ciencias, Universidade da Coruña, Campus de A Coruña, E-15071 A Coruña, Galicia, Spain

^d ECIMAT, Universidade de Vigo, Illa de Toralla s.n., 36331 Vigo, Galicia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 October 2014

Received in revised form

26 January 2015

Accepted 9 February 2015

Available online 25 February 2015

Keywords:

Mytilus galloprovincialis

Biomarkers

4-Nonylphenol

Bioaccumulation

Acetylcholinesterase

Antioxidant enzymes

ABSTRACT

Wild marine mussels, *Mytilus galloprovincialis* showed a moderate bioaccumulation ability when exposed to waterborne 4-nonylphenol (4-NP), with a bioconcentration factor (BCF) of 6850 L Kg⁻¹ (dry weight). Kinetic and concentration-response experiments were performed and three enzymatic biomarkers in mussel gills were measured: Glutathione S-transferase (GST), glutathione peroxidase (GPx) and acetylcholinesterase (AChE). Exposure of mussels to environmentally relevant concentrations (25–100 µg L⁻¹) of 4-nonylphenol significantly inhibited the AChE activity and induced the GST and GPx activities. GST induction was dose dependent whilst GPx activity showed a less consistent pattern, but in both cases the induction remained after a 10 d depuration period. Mussels seem capable of eliminating 4-NP from their tissues through a mechanism involving GST induction.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

It is well known that a large number of organic pollutants found in different compartments of the aquatic environment may be uptaken and damage organisms and human health. Among them, alkylphenols (APs) are of concern due to their wide use, ubiquity and toxicological effects (David et al., 2009). These compounds are constituents of household and industrial products as herbicides, detergents and plasticizers. Furthermore, octyl- and nonylphenols are used in the production of their ethoxylate derivatives (alkyl-phenolethoxylates), one of the main non-ionic surfactants (Navarro et al., 2010). On the other hand, APs belong to synthetic endocrine disrupting chemicals, a group of substances which can alter immune functions, produce sexual dysfunction or cause cancer at low concentrations (reviewed by Salgueiro-González et al., 2012a).

In order to protect the aquatic environment and human health, the Directive 2008/105/EC included 4-tert-octylphenol (4-tOP) and 4-nonylphenol (4-NP) in the list of 33 priority substances of concern in European waters. The recent Directive 2013/39/EU sets environmental quality standards (EQS) for these compounds in water, but EQS values in biota were not established yet because of the scarce data available on 4-NP bioaccumulation and effects on aquatic organisms, a topic addressed in this study.

On the other hand, marine pollution monitoring currently relies on the study of biological effects of chemical pollutants, including enzymatic biomarkers (ICES, 2011) of exposure (e.g. GST, GPx) and effect (e.g. AChE). Active monitoring in an industrialised area has demonstrated that mussels from the most polluted sites consistently exhibited a significantly higher GST and GPx activities compared to the control site, whereas AChE activity was significantly inhibited (Vidal-Liñán et al., 2014). The present study investigates the effects of 4-NP exposure on an antioxidant enzyme: Glutathione Peroxidase (GPx); a Phase II detoxification enzyme: Glutathione S-Transferase (GST), and the neurotransmitter

* Corresponding author.

E-mail address: leticia1582@uvigo.es (L. Vidal-Liñán).

catabolism enzyme Acetylcholinesterase (AChE).

GPx protects cells against the deleterious effects of oxyradical generation by maintaining endogenous reactive oxygen species at relatively low levels, and attenuating the damages related to their high reactivity (Livingstone, 1990). This enzyme catalyses the reduction of hydrogen peroxide into water or organic peroxides to their corresponding stable alcohols by oxidizing the reduced glutathione (GSH) into its oxidized form (GSSG). A relationship between PAH exposure and the increase in antioxidant defences (e.g. CAT and GPx) has been suggested (Cheung et al., 2004), but mostly related to high molecular weight PAHs (e.g. B[a]P). Nevertheless, consistency of results has not always been achieved and a reduction or no-effect on these parameters has also been reported (Porte et al., 2000; Livingston, 2001; Kasiotis et al., 2015).

GST are Phase II detoxification enzymes involved in the conjugation and detoxification of organic compounds, which also play a protective role against oxidative stress by catalysing a selenium-independent glutathione peroxidase activity (Prohaska, 1980; reviewed by Sheehan et al., 2001). GST activity has been widely used as a biomarker of exposure to PAHs, PCBs and trace metals both in fish and invertebrates (Fitzpatrick et al., 1997; Funes et al., 2006), and has been recently identified as a suitable biomarker for monitoring chemical pollution in highly productive marine coastal ecosystems (Vidal-Liñán et al., 2010).

Acetylcholinesterase (AChE) is an essential enzyme in the transmission of the nerve impulse that degrades acetylcholine to choline and acetic acid in the synaptic gap of cholinergic synapses and neuromuscular junctions. AChE activity is unselectively inhibited by metals, and selectively inhibited by organophosphate and carbamate pesticides, leading to severe physiological impairment in marine organisms (Rickwood and Galloway, 2004; Tsangaris et al., 2010). Thus, the inhibition of AChE activity in mussels has been frequently used as an effect biomarker after exposure to certain metals such as lead and mercury and to pesticides (e.g. Bocquene and Galgani, 1990). In addition, AChE has been identified as a suitable biomarker for incorporation into the OSPAR Coordinated Environmental Monitoring Programme (CEMP) (ICES, 2011). This is in our knowledge the first report of 4-NP effects in AChE activity in bivalves.

The aim of the present work was to study the bioaccumulation of 4-NP in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and the effects on the antioxidant enzyme: GPx; the Phase II detoxification enzyme: GST, and the neurotransmitter catabolism enzyme: AChE, in order to contribute to the establishment of EQS in marine biota.

2. Materials and methods

2.1. Experimental procedure

Mussels between 40 and 45 mm shell length were collected from a pristine area from the outer part of Ria de Vigo (NW Iberian coast), cleaned from epibionts, and acclimated to incubation conditions in the laboratory for one week prior to experiments. Acclimatization was made in a 150 L fibreglass tank with running seawater inside an isothermal chamber at 15 °C in the dark, and mussels were fed as in the exposure period (see below). Exposure was made in 30 L glass tanks with 20 mussels per tank, at constant temperature (15 °C), in darkness, using 1 µm filtered seawater with oceanic characteristics. These tanks were continuously aerated with 0.22 µm filtered air, and were allowed to equilibrate for 1 h, before introducing the mussels. Water was renewed three times per week after feeding mussels for 1 h with a mixed diet of *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis suecica* and *Chaetoceros gracilis*. Exposure tanks were spiked using a stock solution of 75 mg L⁻¹ 4-NP, 99.9% purity from SUPELCO Analytical (CAS 104-40-5) dissolved in

dimethylsulphoxide (DMSO) (99.9% purity from PANREAC). Fresh stock solutions were prepared every 7 days and stored at 5 °C in the dark.

Preliminary trials showed an exponential decay in actual 4-NP concentrations in the water; consequently every day without water renewal 4-NP was spiked to maintain nominal concentrations.

Water samples were taken at 0 h to check the initial concentration and at 24, 96 and 120 h before water renewal to monitor the concentration of 4-NP in the exposure media.

2.2. Kinetics experiment

To evaluate the kinetics of uptake and effects of 4-NP on the biomarkers after different exposure times, over 450 mussels were exposed for 30 d to seawater control and experimental solutions containing 75 µg L⁻¹ of 4-NP (0.34 µM), followed by a 10 d depuration period. Mussel's samples were taken for biochemical and chemical analyses after 0, 2, 5, 9, 15, 20 and 30 d exposure, and after 10 d of depuration.

2.3. Concentration-response experiment

To study the concentration-response relationship between 4-NP exposure and the biomarker responses, over 240 mussels were exposed for 30 d to seawater control and experimental solutions containing 25, 50, 75, 100 µg L⁻¹ of 4-NP (0.11 µM, 0.23 µM, 0.34 µM and 0.45 µM, respectively). After 0, 7 and 30 d exposure, samples were taken for biochemical and chemical analyses.

In both experiments seawater control, DMSO control and 4-NP treatment groups were processed at the same time. DMSO control and 4-NP treatment tanks contained <0.1% (v/v) DMSO which was maintained constant in all treatments for a given experiment.

Thirty individuals from each experimental group were taken at every sampling time. Gills from 24 mussels were dissected out, frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until processed for biomarker analysis. Studied end-points included AChE, GST and GPx activities of the gills. The remaining 6 individuals from each treatment were used for chemical analyses.

2.4. Chemical analyses in water and mussels

The analysis of water samples was carried out by dispersive liquid-liquid extraction (DLLME) followed by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS), according to a previous methodology published by Salgueiro-González et al. (2012a). Briefly, 30 mL of seawater were extracted with 100 µL of 1-octanol and the mixture was vigorously shaken during 5 min at 1200 rpm and then separated upon centrifugation. The fine droplets of 1-octanol were collected and up to 1 mL with methanol and filtered before LC injection.

Mussel tissues were extracted by selective pressurized liquid extraction (SPLE) and determined by HPLC-MS/MS, as it was previously described by Salgueiro-González et al. (2012b). In summary, 0.5 g of freeze-dried mussel samples was blended with a dispersing agent (C18, 1.5 g) until homogenization and extracted with methanol at 40 °C using an ASE 200 instrument (Dionex, Sunnyvale, CA, U.S.A.). At the bottom of the extraction cell the sorbent (neutral alumina 5% water deactivated, 3 g) was placed for the simultaneous clean-up of the co-extracts. The PLE extracts were reduced almost dryness in a Syncore® Analyst evaporator from Büchi Labortechnik AG (Flawil, Switzerland) and up to 1 mL of methanol before LC injection.

LC determination was performed (in both cases) using an Agilent HP-1200 Series LC system coupled to a mass spectrometer with a triple quadrupole detector and an APCI/ESI source (API 3200,

Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Multiple-reaction monitoring (MRM) were registered for chosen as an acquisition mode because of its sensitivity and selectivity.

Both analytical methodologies were optimized and validated in terms of linear range, accuracy and precision and satisfactory results were obtained.

2.5. Bioaccumulation model

Bioaccumulation was modelled assuming first-order kinetics and constant 4-NP concentration in water according to the expression (Landrum et al., 1992):

$$C_a(t) = \frac{C_w K_u}{K_d} (1 - e^{-K_d t}) \quad (1)$$

where $C_a(t)$ is the concentration ($\mu\text{g Kg}^{-1}$) accumulated in mussels at time t , C_w is the 4-NP water concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$), K_u is the uptake rate coefficient ($\text{mL Kg}^{-1} \text{d}^{-1}$), K_d is the depuration rate coefficient (d^{-1}) and t is the time (days). K_u and K_d were estimated by least square fits of the accumulation data to equation (1) model.

The bioconcentration factor (BCF) is usually calculated as the ratio of the uptake rate coefficient to the depuration rate coefficient ($\text{BCF} = K_u/K_d$) (mLg^{-1}). The equation (1) can be reparametrised to obtain directly the confidence intervals of BCF:

$$C_a(t) = C_w \text{BCF} (1 - e^{-K_d t}) \quad (2)$$

2.6. Biomarker analyses

GST and GPx were analysed in the gills since they are the first organ to be exposed to waterborne pollutants and constitute the major entry site for uptake of dissolved pollutants, therefore it is reasonable to expect that the level of oxidative processes in this tissue is maximal. In a previous study (Vidal-Liñán and Bellas, 2013) we found that GST, GPx and AChE activities are higher in gills than in the digestive gland of mussels. Gills were homogenized with an Ultra-Turrax, at 1:2 w/v ratio, in 0.05 M potassium-phosphate buffer at pH 7.5 containing 2 mM EDTA. Samples were centrifuged at $15,000 \times g$ for 15 min at 4–7 °C. For the analysis of AChE activity, the gills were weighed and homogenized with a Potter glass homogenizer at a 1:2 w/v ratio, in 0.02 M phosphate buffer at pH 7.0 with 0.1% Triton X-100 and centrifuged at $10,000 \times g$ for 10 min at 4 °C. Aliquots of the supernatant were utilized for the spectrophotometric determination of activity of the enzymes GST, GPx and AChE with an absorbance microplate reader (BiotekELX 808) at a constant temperature of 20 °C.

The activity of AChE was spectrophotometrically determined, as described in Bocquené and Galgani (1998), by measuring the increase in absorbance of the sample at 412 nm in the presence of 2.6 mM acetylthiocholine as substrate and 0.5 mM 5,5'- dithiobis-2-dinitrobenzoic acid.

Table 1

Actual 4-NP concentrations measured in the exposure water. After 24, 96 and 120 h exposure samples were taken for analysis. Water was spiked every 24 h with the nominal 4-NP concentrations. n.m. not measured.

Nominal concentration ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Measured concentration ($\mu\text{g L}^{-1}$)				
	t_0	t_{24}	$t_{24} \pm \text{Toxic}$	t_{96}	t_{120}
25	28	1.3	29	2.8	0.5
50	44	5.3	40	5.8	1.1
75	74	6.4	23	n.m.	n.m.
100	91	9.8	84	10	1.5

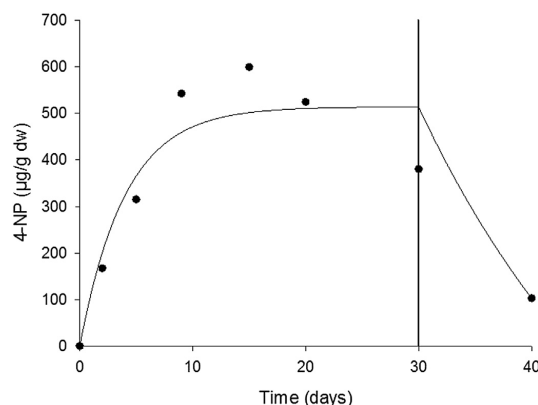


Fig. 1. Concentration of 4-NP in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) exposed for 30 days to $75 \mu\text{g L}^{-1}$ and placed in clean seawater for 10 further days. (Adjusted $R^2 = 0.84$).

GST activities were evaluated, according to Habig et al. (1974), using 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) as substrate. The measurement was carried out at 340 nm (extinction coefficient, $\epsilon = 9.6 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$) in 0.1 M potassium-phosphate buffer at pH 6.5, 60 mM CDNB and 10 mM GSH.

GPx activity was measured in a coupled enzyme system where NADPH is consumed by glutathione reductase to convert the formed oxidized glutathione form (GSSG) to its reduced form (GSH), according to Halliwell and Gutteridge (1999). The decrease of absorbance was monitored at 340 nm ($\epsilon = 5.598 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$) in 0.1 M potassium-phosphate buffer at pH 6.5, 10 mM sodium azide (NaN_3), 40 mM GSH, 20 unit mL^{-1} glutathione reductase, 2.4 mM NADPH and 2 mM hydrogen peroxide as substrate.

Protein concentrations in the supernatants were measured according to Lowry et al. (1951) by using bovine serum albumin as standard. All the enzymatic activities are expressed as $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ of protein.

2.7. Statistical analyses

Data normality and homoscedasticity were verified using Shapiro–Wilk and Levene's tests, respectively. Differences among the means of the enzymatic activities in seawater control and DMSO control were analysed by the Student's t-test. Once it was verified that there were no significant differences, DMSO control was used as reference.

In both the kinetics experiment and the concentration:response experiment two independent two-way ANOVA were conducted to evaluate significant ($p < 0.05$) effects of concentration and exposure time, and Bonferroni post-hoc test to test the significance of

Table 2

Nominal 4-NP concentration in water and 4-NP concentrations measured in mussels exposed to different concentrations after 7 and 30 day exposure. n.m. not measured.

Nominal concentration in water ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Measured concentration in mussel ($\mu\text{g g}^{-1} \text{dw}$)	
	t_7	t_{30}
25	75	246
50	194	282
75	n.m.	380
100	235	382

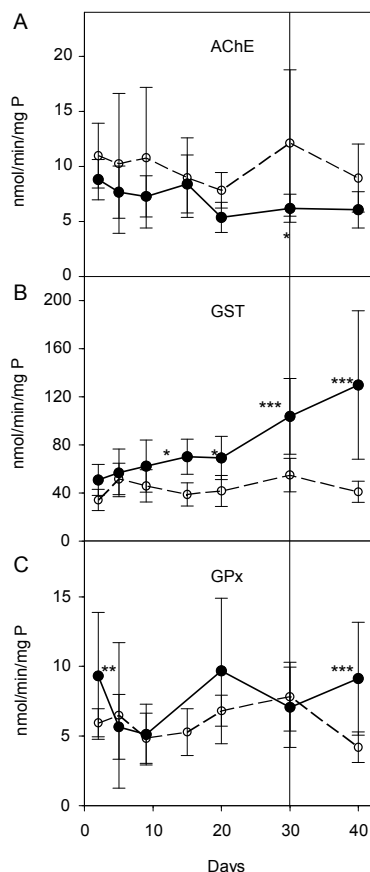


Fig. 2. AChE (A), GST (B) and GPx (C) activities in gills of mussels exposed to $75 \mu\text{g L}^{-1}$ of 4-NP during 30 days and after 10 days recovery in clean seawater. Open and close symbols represent DMSO control and treatment, respectively. Values show mean \pm standard deviation ($n = 12$). Asterisks indicate significant differences with respect to DMSO control (Bonferroni test; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

differences between treated samples and related DMSO controls. The tests were performed using the SPSS statistical package version 15.0 and GraphPad Prism software version 4.01.

3. Results

3.1. Mussel bioaccumulation

Analysis of water samples (Table 1) revealed that initial 4-NP concentrations were 88–112% of the nominal concentrations. A marked decrease in actual 4-NP concentrations was observed already after 24 h; however, daily spiking with the 4-NP stock solution generally restored nominal concentrations.

4-NP concentrations in mussel tissues measured before exposure were $0.295 \mu\text{g g}^{-1}\text{dw}$. Those concentrations are similar to the background levels found in the NW Iberian coast (Salgueiro-González et al., 2012b). The uptake of waterborne 4-NP was very rapid, and after only 48 h of exposure to $75 \mu\text{g L}^{-1}$ 4-NP, the tissular concentration was $167 \mu\text{g g}^{-1}\text{dw}$. The uptake was

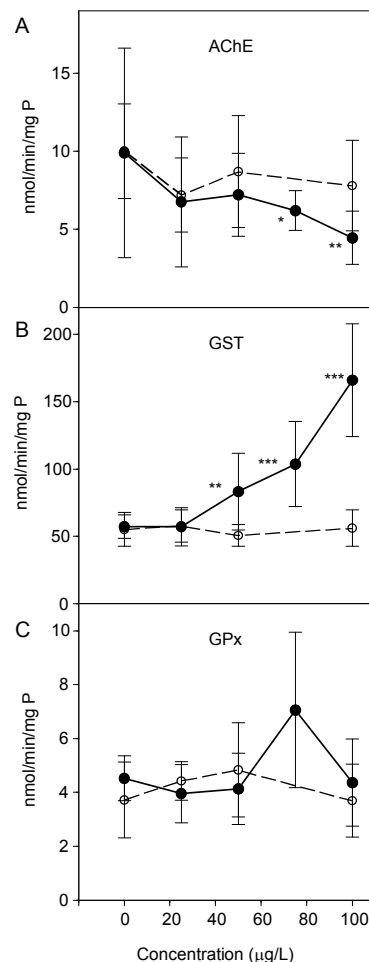


Fig. 3. AChE (A), GST (B) and GPx (C) activities in gills of mussels exposed to 0 (DMSO control), 25, 50, 75 and $100 \mu\text{g L}^{-1}$ of 4-NP during 7 days (open symbols) and 30 days (closed symbols). Values show mean \pm standard deviation ($n = 12$). Asterisks indicate significant differences with respect to DMSO control (Bonferroni test; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

approximately linear with time up to 9 days of exposure; nevertheless saturation was later observed, and a maximum of $599 \mu\text{g g}^{-1}$ was reached at day 15, with decreasing 4-NP concentrations further on (Fig. 1). Kinetics of bioaccumulation were fitted to the classical saturation model described by equation (1), resulting a $R^2 = 0.84$, and statistical significance $p < 0.005$. According to this model, the bioconcentration factor (BCF) was $6850 \pm 1850 \text{ L Kg}^{-1}$, with an uptake rate coefficient (K_u) of $1702.5 \pm 1549.6 \text{ L Kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$ and an excretion rate of $0.248 \pm 0.263 \text{ d}^{-1}$. The dose response experiments showed that uptake rate was dose-dependent 4-NP during the first few days (Table 2); however, saturation took place disregarding exposure concentrations, and at the end of the 30 d exposure 4-NP concentrations were 246, 282, 380 and $382 \mu\text{g g}^{-1}\text{dw}$, in mussels exposed to 25, 50, 75 and $100 \mu\text{g L}^{-1}$, respectively.

3.2. Biomarker analyses

Fig. 2 shows AChE, GST and GPx activities in gills of mussels exposed to $75 \mu\text{g L}^{-1}$ of 4-NP for 30 d, plus a 10 d depuration period. For the three biomarkers analysed, baseline levels are comparable with those obtained in wild mussels from pristine areas of the NW Iberian coast (Vidal-Liñán et al., 2010; Vidal-Liñán and Bellas, 2013).

AChE activity was lower in 4-NP exposed mussels, with independence of exposure time, but the inhibition was statistically significant ($p < 0.05$) only after 30 d exposure (Fig. 2). GST activity in exposed animals showed significant induction after 15, 20, 30 d exposure, and the induction was maintained after the 10 d depuration period (Fig. 2). In the case of the GPx activity in gills, the pattern of response was more variable, and GPx activity showed significant induction only at the 2 d exposure time (Fig. 2). As in the case of GST, the induction was maintained after the depuration period.

Fig. 3 shows AChE, GST and GPx activities in gills of mussels exposed to 25, 50, 75 and $100 \mu\text{g L}^{-1}$ of 4-NP for 7 and 30 d. For the three biomarkers analysed a 7 d exposure period was not sufficient to elicit any significant response. In contrast, after 30 d, AChE showed a significant inhibition at high exposure levels (75 and $100 \mu\text{g L}^{-1}$), and GST was significantly induced in animals exposed to 50, 75 and $100 \mu\text{g L}^{-1}$. Again, the pattern of response of GPx was less consistent, and the marked increase in activity found at $75 \mu\text{g L}^{-1}$ was not statistically significant.

4. Discussion

4.1. Bioaccumulation

The first order bioaccumulation model (equation (1)) described accumulation of 4-NP in marine mussels ($p < 0.005$), resulting a BCF of 6850 L Kg^{-1} . This is within the range of BCF values previously reported for bivalves, from 1860 (Gatidou et al., 2010) to 13700 L Kg^{-1} dry weight (Ekelund et al. (1990); Lietti et al. (2007), assuming fresh weight is 5 times dry weight), and similar to the mean of the published values (7898 L kg^{-1}). Ricciardi et al. (2008) found a 4-NP concentration of $230 \mu\text{g g}^{-1}$ dw after 7 d exposure to $100 \mu\text{g L}^{-1}$, which fits well with the present results (see Fig. 1). However, in the exposure phase of the kinetics experiment we have found that 4-NP tissular concentration did not achieve equilibrium, and a sharp decrease in tissular concentration was observed after the peak at day 15 (see Fig. 1). Because of that, the saturation model fits to the experimental data with a moderate goodness of fit ($R^2 = 0.84$). In fact the value of the excretion rate constant predicted by the model, $0.248 \pm 0.263 \text{ d}^{-1}$, is not significant ($p = 0.059$).

Therefore, accumulation of 4-NP in mussels seems to be moderate compared to other organic pollutants. In parallel experiments we have found a BCF of 10900 L kg^{-1} for BDE-47 and 9324 L Kg^{-1} for PCB-153 (Vidal-Liñán et al., 2015). Furthermore, the depuration rate constant found, K_d , shows a high value (0.248 d^{-1}), equivalent to a half life for 4-NP in the soft tissues of only 2.79 days, remarking the high depuration ability of the mussel. Lietti et al. (2007) found a 4-NP half life in clams of just 4.1 days. This high depuration ability is consistent with our findings showing statistically significant induction of GST activity after 15 d exposure to 4-NP (see below). Fish can biotransform 4-NP into readily excretable metabolites (Arukwe et al., 2000), and the present results support that bivalves have also the ability for 4-NP biotransformation through a pathway involving the induction of the phase II enzyme GST (see below).

4.2. Molecular biomarkers

AChE has long been considered as a specific biomarker for

organophosphate and carbamate insecticides (Galgani and Bocquené, 1989; Escartín and Porte, 1997). Recent studies have shown that other types of pollutants, such as heavy metals, surfactants and PAHs, may also inhibit AChE activity (Guilhermino et al., 1998; Akcha et al., 2000; Regoli and Principato, 1995; Grintzalis et al., 2012). We have found that 4-NP, an endocrine disruptor, is also a neurotoxic compound for mussels, significantly inhibiting AChE activity at concentrations from 75 to $100 \mu\text{g L}^{-1}$ after 30 d exposure. This is in our knowledge the first report of AChE inhibition in *M. galloprovincialis* by 4-NP. In agreement with our results, Li (2008a) has found significant inhibition of muscle AChE activity in fish after 4-day exposure in 150 and $300 \mu\text{g L}^{-1}$ of NP. In other study with the planarian *Dugesia japonica* (Li, 2008b), cholinesterase activity was significantly inhibited in organisms exposed to 0.5 mg L^{-1} for 96 h.

The induction of GST activity has been suggested to be adopted for use as a biomarker of exposure to chemicals such as PAHs, PCBs and dioxins (Van der Oost et al., 2003). In the present work, the decrease of 4-NP tissular concentration, observed after 15 d exposure was concomitant with an induction of GST activity, which was significantly increased compared to non-exposed mussels from day 15 on. Interestingly, increased GST activity continued after mussels were transferred into clean seawater, in the depuration phase of the experiments, suggesting that tissue burdens, rather than concentration in water, controls the induction. In this regard, Sanchez et al. (2006) suggest that the GST induction in liver of the fish *Gasterosteus aculeatus*, after 21 d exposure to a commercial nonylphenol polyethoxylate adjuvant, could be explained by the phenol group of nonylphenol, making it directly available to GST, as well as by lipid peroxidation. Also a certain delay in this control cannot be discarded.

The increase of the GST activity followed a concentration:response pattern within the range of 4-NP concentrations studied. A concentration-dependent induction of the GST activity on *M. galloprovincialis* digestive gland, was also observed by Canesi et al. (2008) in response to a mixture of endocrine disruptor compounds (including NP), indicating significant metabolism via phase-II biotransformation. Other study has shown the induction of the GST enzyme on *M. galloprovincialis* digestive gland exposed to the endocrine disruptor bisphenol-A (Canesi et al., 2007). In contrast, Riva et al. (2010) noted that the GST activity in zebra mussels exposed to different concentrations of 4-NP was not affected.

The biotransformation of 4-NP in fish seems to involve conjugation of the oxidised 4-NP metabolite with glucuronic acid (Thibaut et al., 2000; Smith and Hill, 2004). In contrast, this study suggest that 4-NP metabolism in mussels includes conjugation with glutathione, considering the induction of GST after NP exposure, which is in agreement with the above mentioned studies on other endocrine disruptors (Canesi et al., 2007, 2008).

GPx enzyme catalyses the reduction of hydrogen peroxide into water, or the reduction of organic peroxides to their corresponding stable alcohols by oxidizing the reduced glutathione (GSH) into its oxidized form (GSSG). An increased GPx activity has been reported in marine invertebrate species in response to low intracellular H_2O_2 concentrations (Orbea and Cajaraville, 2006), representing a major pathway in the cell for metabolizing H_2O_2 and lipid peroxides. However, in this work GPx activity has not shown such a consistent pattern as the GST and AChE activities. This was already observed in a previous work (Vidal-Liñán et al., 2013). When GPx activities in mussels exposed to $75 \mu\text{g L}^{-1}$ 4-NP were compared to the corresponding controls at the same exposure times, a significant induction was found at 2 and 40 d. In contrast, when mussels were exposed to 25, 50 and $100 \mu\text{g L}^{-1}$, GPx activity was not affected. In accordance with our results, Riva et al. (2010) reported that GPx

activity of zebra mussels was not altered by exposure to different concentrations of 4-NP (1, 10 and 50 $\mu\text{g L}^{-1}$) and suggest that oxidative stress might not be directly involved in 4-NP toxicity.

In conclusion, we have found evidence of 4-NP biotransformation ability in the mussels *M. galloprovincialis*, leading to moderate bioaccumulation due to their capacity for elimination of this compound. The biotransformation seems to involve GST, which is significantly induced in a dose:response pattern with 4-NP exposure. Further research is needed to elucidate the molecular mechanism behind the GST induction, most likely mediated by the formation of some 4-NP oxidized metabolite that we did not target in the present study.

This study also validated the use of AChE and GST activities in mussels as biomarkers of exposure to 4-NP. The GST was the most sensitive biomarker, responding to concentrations from 50 $\mu\text{g L}^{-1}$, and showing increased induction as exposure time increased. We report for first time neurotoxic effects in mussels due to the exposure to environmentally relevant concentrations of 4-NP that caused an inhibition of the AChE activity.

Acknowledgements

Authors are grateful to Marta Miñambres, Tania Tato and Diego Rial for their technical assistance and personnel at ECIMAT. This work was financed by the Spanish Ministry of Science and Innovation through the Research Project (CTM2009-10908/CTM2013-48194-C3-2-R). The first author was granted with a FPU fellowship from the Spanish Government. N. Salgueiro-González acknowledges Xunta de Galicia and Campus do Mar International Campus of Excellence for Ph.D. grant.

References

- Akcha, F., Izuel, C., Venier, P., Budzinski, H., Burgeot, T., Narbonne, J.-F., 2000. Enzymatic biomarker measurement and study of DNA adduct formation in benzo[a]pyrene-contaminated mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol.* 49, 269–287.
- Arukwe, A., Thibaut, R., Ingebrigtsen, K., Celius, T., Goksøyr, A., Cravedi, J.-P., 2000. In vivo and in vitro metabolism and organ distribution of nonylphenol in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquat. Toxicol.* 49, 289–304.
- Bocquené, G., Galgani, F., Truquet, P., 1990. Characterization and assay conditions for use of AChE activity from several marine species in pollution monitoring. *Mar. Environ. Res.* 30, 75–89.
- Bocquené, G., Galgani, F., 1998. Biological effects of contaminants: cholinesterases inhibition by organophosphate and carbamate compounds. *ICES Tech. Mar. Environ. Sci.* 22, 1–13.
- Canesi, L., Borghi, C., Ciacci, C., Fabbri, R., Vergani, L., Gallo, G., 2007. Bisphenol-A alters gene expression and functional parameters in molluscan hepatopancreas. *Mol. Cell. Endocrinol.* 276, 36–44.
- Canesi, L., Borghi, C., Ciacci, C., Fabbri, R., Lorusso, L.C., Vergani, L., Marcomini, A., Poiana, G., 2008. Short-term effects of environmentally relevant concentrations of EDC mixtures on *Mytilus galloprovincialis* digestive gland. *Aquat. Toxicol.* 87, 272–279.
- Cheung, C.C.C., Siu, W.H.L., Richardson, B.J., De Luca-Abbott, D.B., Lam, P.K.S., 2004. Antioxidant responses to benzo[a]pyrene and Aroclor 1254 exposure in the green-lipped mussel, *Perna viridis*. *Environ. Pollut.* 128, 393–403.
- David, A., Fenet, H., Gomez, E., 2009. Alkylphenols in marine environments: distribution monitoring strategies and detection considerations. *Mar. Pollut. Bull.* 58, 953–960.
- Directive 2008/105/EC, 2008. Environmental Quality Standards in the Field of Water Policy, Amending and Subsequently Repealing Council Directives 82/176/EEC, 83/513/EEC, 84/156/EEC, 84/491/EEC, 86/280/EEC and Amending Directive 2000/60/EC. European Parliament and the Council of the European Union.
- Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council of 12 August 2013 Amending Directives 2008/105/EC as Regards Priority Substances in the Field of Water Policy, 2013. European Parliament and the Council of the European Union.
- Ekelund, R., Bergman, A., Granmo, A., Berggren, M., 1990. Bioaccumulation of 4-nonylphenol in marine animals—a re-evaluation. *Environ. Pollut.* 64, 107–120.
- Escartin, E., Porte, C., 1997. The use of cholinesterase and carboxylesterase activities from *Mytilus galloprovincialis* in pollution monitoring. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 2090–2095.
- Fitzpatrick, P.J., O'Halloran, J., Sheehan, D., Walsh, A.R., 1997. Assessment of a glutathione S-transferase and related proteins in the gill and digestive gland of *Mytilus edulis* (L.), as potential organic pollution biomarkers. *Biomarkers* 2, 51–56.
- Funes, V., Alhama, J., Navas, J.I., López-Barea, J., Peinado, J., 2006. Ecotoxicological effects of metal pollution in two mollusc species from the Spanish South Atlantic littoral. *Environ. Pollut.* 139, 214–223.
- Galgani, F., Bocquené, G., 1989. A method for routine detection of organophosphates and carbamates in sea water. *Environ. Technol. Lett.* 10, 311–322.
- Gatidou, G., Vassalou, E., Thomaidis, N.S., 2010. Bioconcentration of selected endocrine disrupting compounds in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Mar. Poll. Bull.* 60, 2111–2116.
- Grintzalis, K., Georgiou, C.D., Dailianis, S., 2012. Total thiol redox status as a potent biomarker of PAH-mediated effects on mussels. *Mar. Environ. Res.* 81, 26–34.
- Guilhermino, L., Barros, P., Silva, M.C., Soares, A.M.V.M., 1998. Should the use of inhibition of cholinesterases as a specific biomarker for organophosphate and carbamate pesticides be questioned? *Biomarkers* 3 (2), 157–163.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130–7139.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1999. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford Univ. Press, Oxford.
- ICES, 2011. Report of the Study Group on Integrated Monitoring of Contaminants and Biological Effects (SGIMC), 14–18 March 2011, Copenhagen, Denmark, vol. 30. *ICES CM 2011/ACOM*, p. 265.
- Kasiotis, K.M., Emmanouil, C., Anastasiadou, P., Papadi-Psyllou, A., Papadopoulos, A., Okay, O., Machera, K., 2015. Organic pollution and its effects in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* in Eastern Mediterranean coasts. *Chemosphere* 119, S145–S152.
- Landrum, P.F., Lee II, H., Lydy, M.J., 1992. Toxicokinetics in aquatic systems: model comparisons and use in hazard assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 1709–1725.
- Li, M.H., 2008a. Effects of nonylphenol on cholinesterase and carboxylesterase activities in male guppies (*Poecilia reticulata*). *Ecotox. Environ. Safe* 71, 781–786.
- Li, M.H., 2008b. Effects of nonionic and ionic surfactants on survival, oxidative stress, and cholinesterase activity of planarian. *Chemosphere* 70, 1796–1803.
- Lietti, E., Marin, M.G., Matozzo, V., Polesello, S., Valsecchi, S., 2007. Uptake and elimination of 4-nonylphenol by the clam *Tapes philippinarum*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 53, 571–578.
- Livingstone, D.R., 1990. Cytochrome P-450 and oxidative-metabolism in invertebrates. *Bioch. Soc. Trans.* 18, 15–19.
- Livingstone, D.R., 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Pollut. Bull.* 42, 656–666.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 266–275.
- Navarro, P., Bustamante, J., Vallejo, A., Prieto, A., Usobiaga, A., Arrasate, S., Anakabe, E., Puy-Azurmendy, E., Zuloaga, O., 2010. Determination of alkylphenols and 17 β -estradiol in fish homogenate. Extraction and clean-up strategies. *J. Chromatogr. A* 1217, 5890–5895.
- Orbea, A., Cajaraville, M.P., 2006. Peroxisome proliferation and antioxidant enzymes in transplanted mussels of four Basque estuaries with different levels of polycyclic aromatic hydrocarbon and polychlorinated biphenyl pollution. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 1616–1626.
- Porte, C., Biosca, X., Solé, M., Albaigés, J., 2000. The Aegean Sea oil spill on the Galician coast (NW Spain). III: the assessment of long-term sublethal effects on mussels. *Biomarkers* 6, 335–350.
- Prohaska, J.R., 1980. The glutathione peroxidase activity of glutathione S-transferase. *Biochim. Biophys. Acta* 611, 87–98.
- Regoli, F., Principato, G., 1995. Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 31, 143–164.
- Rickwood, C.J., Galloway, T.S., 2004. Acetylcholinesterase inhibition as biomarker of adverse effect: a study of *Mytilus edulis* exposed to the priority pollutant chlorfenvinphos. *Aquat. Toxicol.* 67, 45–56.
- Ricciardi, F., Matozzo, V., Gabriela-Marin, M., 2008. Effects of 4-nonylphenol exposure in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and crabs (*Carcinus aestuarii*) with particular emphasis on vitellogenin induction. *Mar. Pollut. Bull.* 57, 365–372.
- Riva, C., Porte, C., Binelli, A., Provini, A., 2010. Evaluation of 4-nonylphenol in vivo exposure in *Dreissena polymorpha*: bioaccumulation, steroid levels and oxidative stress. *Comp. Biochem. Phys. C* 152, 175–181.
- Salgueiro-González, N., Concha-Graña, E., Turnes-Carou, I., Muniategui-Lorenzo, S., López-Mahía, P., Prada-Rodríguez, D., 2012a. Determination of alkylphenols and bisphenol A in seawater samples by dispersive liquid–liquid microextraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry for compliance with environmental quality standards (Directive 2008/105/EC). *J. Chromatogr. A* 1223, 1–8.
- Salgueiro-González, N., Turnes-Carou, I., Besada-Montenegro, V., Viñas-Diéguez, L., Muniategui-Lorenzo, S., López-Mahía, P., 2012b. Levels of alkylphenols and bisphenol A in mussel samples from the North-Notwest coast of Spain. In: 7th European Conference on Pesticides and Related Organic Micropollutants in the Environment and 13th Symposium on Chemistry and Fate of Modern Pesticides. Porto, 7–10th of October.
- Sanchez, W., Palluel, O., Lagadic, L., Ait-Aïssa, S., Porcher, J.-M., 2006. Biochemical effects of nonylphenol polyethoxylate adjuvant, Diquat herbicide and their mixture on the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.). *Mar. Environ. Res.* 62, S29–S33.
- Sheehan, D., Meade, G., Foley, V.M., Dowd, C.A., 2001. Structure, function and

- evolution of glutathione transferase for classification of non-mammalian members of an ancient superfamily. *Biochem. J.* 360, 1–16.
- Smith, M.D., Hill, E.M., 2004. Uptake and metabolism of technical nonylphenol and its brominated analogues in the roach (*Rutilus rutilus*). *Aquat. Toxicol.* 69, 359–369.
- Thibaut, R., Jumel, A., Debrauwer, L., Rathahao, E., Lagadic, L., Cravedi, J.P., 2000. Identification of 4-n-nonylphenol metabolic pathways and residues in aquatic organisms by HPLC and LC-MS analyses. *Analisis* 28 (9).
- Tsangaris, C., Kormas, K., Strogyloudi, E., Hatzianestis, I., Neofitou, C., Andral, B., Galgani, F., 2010. Multiple biomarkers of pollution effects in caged mussels on the Greek coastline. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 151, 369–378.
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.E.P., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharm.* 13, 57–149.
- Vidal-Liñán, L., Bellas, J., Campillo, J.A., Beiras, R., 2010. Integrated use of antioxidant enzymes in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, for monitoring pollution in highly productive coastal areas of Galicia (NW Spain). *Chemosphere* 78, 265–272.
- Vidal-Liñán, L., Bellas, J., 2013. Practical procedures for selected biomarkers in mussels, *Mytilus galloprovincialis* — Implications for marine pollution monitoring. *Sci. Total. Environ.* 461–461, 56–64.
- Vidal-Liñán, L., Bellas, J., Etxebarria, N., Nieto, O., Beiras, R., 2014. Glutathione S-transferase, glutathione peroxidase and acetylcholinesterase activities in mussels transplanted to harbour areas. *Sci. Total. Environ.* 470–471, 107–116.
- Vidal-Liñán, L., Bellas, J., Fumega, J., Beiras, R., 2015. Bioaccumulation of BDE-47 and effects on molecular biomarkers acetylcholinesterase, glutathione-S-transferase and glutathione peroxidase in *Mytilus galloprovincialis* mussels. *Ecotoxicology*. <http://dx.doi.org/10.1007/s10646-014-1377-5>.

